[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
G01N 33/68
G01N 33/53

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01815293.7

[43] 公开日 2003 年 12 月 3 日

[11] 公开号 CN 1460181A

[22] 申请日 2001.7.6 [21] 申请号 01815293.7
[30] 优先权
[32] 2000.9.8 [33] KR [31] 2000/0053341
[32] 2000.9.8 [33] KR [31] 2000/0053342
[86] 国际申请 PCT/KR01/01159 2001.7.6
[87] 国际公布 WO02/21140 英 2002.3.14
[85] 进入国家阶段日期 2003.3.7
[71] 申请人 汉城国立大学工业基金会
地址 韩国汉城
[72] 发明人 朴相哲 朴熊洋 朴静水 赵京娥 金德仁
[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司
代理人 丁业平 王维玉
权利要求书 6 页 说明书 31 页 序列表 11 页
附图 21 页

[54] 发明名称 参与细胞衰老的核酸序列和蛋白质

[57] 摘要

本发明涉及参与衰老的核酸序列和蛋白质，特别是涉及包括参与细胞衰老的两栖生理素和小窝蛋白的核酸序列和蛋白质和它们的用途。

ISSN1008-4274

11. 一种调节细胞衰老的组合物，其包括有效量的反义寡核苷酸，所述反义寡核苷酸与编码参与细胞衰老的蛋白的多核苷酸杂交，并由此抑制多核苷酸表达蛋白，其中蛋白选自两栖生理素蛋白和小窝蛋白。

12. 一种调节细胞衰老的组合物，其包括有效量的甲基化试剂或脱甲基化试剂，其中试剂使编码小窝蛋白的多核苷酸的碱基甲基化或脱碱基化。

13. 根据权利要求 9-12 中任一项所述的组合物，其中细胞衍生自哺乳动物细胞。

14. 根据权利要求 9-12 中任一项所述的组合物，其中参与细胞衰老的蛋白为两栖生理素-1 蛋白或小窝蛋白-1。

15. 根据权利要求 10 所述的组合物，其中多核苷酸是 gDNA 或 cDNA。

16. 根据权利要求 10 所述的组合物，其中编码参与细胞衰老的蛋白的多核苷酸包含在真核生物细胞的表达载体中。

17. 根据权利要求 11 所述的组合物，其中参与细胞衰老的蛋白为小窝蛋白。

18. 根据权利要求 17 所述的组合物，其中反义寡核苷酸与小窝蛋白 mRNA 的翻译起始区杂交。

19. 根据权利要求 12 所述的组合物，其中甲基化试剂选自甲基氧化偶氮甲醇乙酸酯、Temozolomide 和 N-甲基-N-亚硝基脲。

1. 一种检测衰老细胞的方法，其包括测定参与细胞衰老的蛋白的量，其中蛋白是选自两栖生理素蛋白和小窝蛋白中的一种或两种。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中细胞衍生自哺乳动物细胞。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中两栖生理素蛋白为两栖生理素-1 蛋白以及小窝蛋白为小窝蛋白-1。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中方法是蛋白质印迹法。

5. 一种检测衰老细胞的方法，其包括测定编码参与细胞衰老的蛋白的多核苷酸的量，其中蛋白是选自两栖生理素蛋白和小窝蛋白中的一种或两种。

6. 根据权利要求 5 所述的方法，其中细胞衍生自哺乳动物细胞。

7. 根据权利要求 5 所述的方法，其中多核苷酸编码两栖生理素-1 或小窝蛋白-1。

8. 根据权利要求 5 所述的方法，其中多核苷酸选自 gDNA、cDNA 和 mRNA。

9. 一种调节细胞衰老的组合物，其包括有效量的参与细胞衰老的细胞蛋白，其中蛋白选自两栖生理素蛋白和小窝蛋白。

10. 一种调节细胞衰老的组合物，其包括有效量的编码参与细胞衰老的蛋白的多核苷酸，其中蛋白选自两栖生理素蛋白和小窝蛋白。

20. 根据权利要求 12 所述的组合物，其中脱甲基化试剂选自 5-氮杂-脱氧胞苷、5-氮杂胞苷、6-氮杂胞苷和 8-氮鸟嘌呤。

21. 根据权利要求 19 或 20 所述的组合物，其中试剂使来自编码小窝蛋白-1 的多核苷酸的启动子的 CpG 岛甲基化或脱甲基化。

22. 一种调节细胞衰老的组合物，其包括有效量的显性负两栖生理素-1 基因。

23. 根据权利要求 22 所述的组合物，其中显性负两栖生理素-1 基因为编码多肽的多核苷酸，所述多肽包括由 SEQ ID NO:2 表示的第 250-588 位氨基酸序列。

24. 一种调节需要的患者中细胞衰老的方法，其包括给患者施用有效量的参与细胞衰老的蛋白，其中蛋白选自两栖生理素蛋白和小窝蛋白。

25. 一种调节需要的患者中细胞衰老的方法，其包括给患者施用有效量的编码参与细胞衰老的蛋白的多核苷酸，其中蛋白选自两栖生理素和小窝蛋白。

26. 一种调节需要的患者中细胞衰老的方法，其包括给患者施用有效量的反义寡核苷酸，所述反义寡核苷酸与编码参与细胞衰老的蛋白的多核苷酸杂交，并由此抑制多核苷酸表达蛋白，其中蛋白选自两栖生理素蛋白和小窝蛋白。

27. 一种调节需要的患者中细胞衰老的方法，其包括给患者施用有效量的甲基化试剂或脱甲基化试剂，其中试剂使编码小窝蛋白的多核苷酸的碱基甲基化或脱甲基化。

28. 根据权利要求 24-27 中任一项所述的方法，其中细胞衍生自哺乳动物细胞。

29. 根据权利要求 24-27 中任一项所述的方法，其中参与细胞衰老的蛋白为两栖生理素-1 蛋白或小窝蛋白-1。

30. 根据权利要求 25 所述的方法，其中多核苷酸是 gDNA 或 cDNA。

31. 根据权利要求 25 所述的方法，其中编码参与细胞衰老的蛋白的多核苷酸包含在真核生物细胞的表达载体中。

32. 根据权利要求 26 所述的方法，其中参与细胞衰老的蛋白为小窝蛋白。

33. 根据权利要求 32 所述的方法，其中反义寡核苷酸与小窝蛋白 mRNA 的翻译起始区杂交。

34. 根据权利要求 27 所述的方法，其中甲基化试剂选自甲基氧化偶氮甲醇乙酸酯、Temozolomide 和 N-甲基-N-亚硝基脲。

35. 根据权利要求 27 所述的方法，其中脱甲基化试剂选自 5-氮杂-脱氧胞苷、5-氮杂胞苷、6-氮杂胞苷和 8-氮鸟嘌呤。

36. 根据权利要求 34 或 35 所述的方法，其中试剂使来自编码小窝蛋白-1 的多核苷酸的启动子的 CpG 岛甲基化或脱甲基化。

37. 一种鉴别影响细胞衰老的物质的方法，其包括下列步骤：

（a） 在待测物质存在下培养细胞；

（b） 自细胞中分离蛋白；

（c） 将分离蛋白与特异于参与细胞衰老的蛋白的抗体接触，其中蛋白选自两栖生理素蛋白和小窝蛋白；以及

（d） 测定分离蛋白与抗体结合的量。

38. 一种鉴别影响细胞衰老的物质的方法，其包括下列步骤：

（a）在待测物质存在下培养细胞；

（b）自细胞中分离 RNA；

（c）将分离 RNA 与衍生自编码参与细胞衰老的蛋白的多核苷酸的探针接触，其中蛋白选自两栖生理素蛋白和小窝蛋白；以及

（d）测定分离 RNA 与编码参与细胞衰老的蛋白的多核苷酸杂交的量。

39. 根据权利要求 37 或 38 所述的方法，其中细胞衍生自哺乳动物细胞。

40. 根据权利要求 37 或 38 所述的方法，其中蛋白为两栖生理素-1 蛋白或小窝蛋白。

41. 一种检测衰老细胞的试剂盒，其包括衍生自编码参与细胞衰老的蛋白的多核苷酸的探针，其中蛋白选自两栖生理素蛋白和小窝蛋白。

42. 根据权利要求 41 所述的试剂盒，其中细胞衍生自哺乳动物细胞。

43. 根据权利要求 41 所述的试剂盒，其中蛋白为两栖生理素-1 蛋白或小窝蛋白-1。

44. 根据权利要求 41 所述的试剂盒，其中探针固定于固相支持物上。

45. 根据权利要求 41-44 中任一项所述的试剂盒，其进一步包括检测探针是否存在的标记。

46. 一种鉴别细胞衰老的生物标记，其包括参与细胞衰老的蛋白，其中蛋白选自两栖生理素蛋白和小窝蛋白。

47. 一种鉴别细胞衰老的生物标记，其包括编码参与细胞衰老的蛋白的多核苷酸，其中蛋白选自两栖生理素蛋白和小窝蛋白。

48. 根据权利要求 46 或 47 所述的生物标记，其中蛋白为两栖生理素-1 或小窝蛋白-1。

参与细胞衰老的核酸序列和蛋白质

发明背景

发明领域

本发明涉及参与衰老的核酸序列和蛋白质，特别是涉及参与细胞衰老的核酸序列和蛋白质和它们的用途。

相关技术说明

对衰老(也称为“老龄化”)的机制已经进行了深入地研究，并提出了各种假设。假设包括(a)老龄化的自由基理论(Harman D, 美国科学院院刊，78，7124-7128(1981))，(b)老龄化的交联理论(Bjorksten J., J. Am. Geriatr Soc., 16, 408-423(1968)), (c)老龄化的线粒体理论(Lee CM 等，Free Radic. Biol. Med., 22, 1259-1269(1997)；和 Wallace DC 等，生物因子，7，187-190(1998))，和(d)老龄化的遗传程序理论(Harley CB 等，Curr. Opin. Genet. Dev., 5, 249-255(1995))。

另外，衰老已经在细胞水平即细胞衰老得到了研究。根据研究，衰老细胞的特征是(a)细胞周期停滞在 G1 期，(b)生理功能降低(Goldstein，科学，249:1129-1133(1990)；Campisi J.，细胞，84:497-500(1996))，和(c)对细胞程序性死亡的抗性(Wang E.，癌症研究，55:2284-2292(1995))。

由于认为细胞反映了个体水平的衰老现象，因此对细胞衰老的各种研究已经用人成纤维细胞来进行(Campisi J.，细胞，84:497-500(1996))。

同时，本申请书涉及 WO 99/52929 和 WO 01/23615 中公开的与老龄化过程相关的核酸和蛋白质。

如上所述，尽管各种理论已经提出，但仍然需要更多的证据来阐明细胞的衰老，需要特定的生物标记来鉴定衰老的细胞，以及需要生物分子来调节细胞衰老。

特别是在某些与衰老相关的疾病如 Werner 综合症和 Hutchinson-Gilford 综合症中，返老还童和恢复正常的生理功能的前景是重要的。

通过这一申请，可参考各种专利和出版物，并在括号中提供了引证。这些专利和出版物的公开以它们的全文引入本申请作为参考，以便更全面地叙述本发明和本发明涉及的本领域的状态。

发明概要

在本发明的一个方面，提供了检测衰老细胞的方法，其包括测定参与细胞衰老的蛋白质的量，其中该蛋白质是选自两栖生理素（amphiphysin）蛋白质和小窝蛋白中的一个或两个。

在本发明的另一个方面，提供了检测衰老细胞的方法，其包括测定编码参与细胞衰老的蛋白质的多核苷酸的量，其中该蛋白质是选自两栖生理素蛋白质和小窝蛋白中的一个或两个。

仍然在本发明的另一个方面，提供了调节细胞衰老的组合物，其含有有效量的参与细胞衰老的蛋白质，其中该蛋白质选自两栖生理素蛋白质和小窝蛋白。

在本发明的其他方面，提供了调节细胞衰老的组合物，其含有有效量的编码参与细胞衰老的蛋白质的多核苷酸，其中该蛋白质选自两栖生理素蛋白质和小窝蛋白。

仍然在本发明的其他方面，提供了调节细胞衰老的组合物，其含

有有效量的与编码参与细胞衰老的蛋白质的多核苷酸杂交的反义寡核苷酸，从而抑制多核苷酸表达该蛋白质，其中该蛋白质选自两栖生理素蛋白质和小窝蛋白。

在本发明的另一个方面，提供调节细胞衰老的组合物，其含有有效量的甲基化试剂或脱甲基化试剂，其中该试剂使编码小窝蛋白的多核苷酸的碱基甲基化或脱甲基化。

仍然在本发明的另一方面，提供了调节细胞衰老的组合物，其含有有效量的显性负两栖生理素-1 基因。

在本发明的其他方面，提供了调节需要的患者中细胞衰老的方法，其包括给患者施用有效量的参与细胞衰老的蛋白质，其中蛋白质选自两栖生理素蛋白质和小窝蛋白。

仍然在本发明的其他方面，提供了调节需要的患者中细胞衰老的方法，其包括给患者施用有效量的编码参与细胞衰老的蛋白质的多核苷酸，其中该蛋白质选自两栖生理素蛋白质和小窝蛋白。

在本发明的另一方面，提供了调节需要的患者中细胞衰老的方法，其包括给患者施用有效量的与编码参与细胞衰老的蛋白质的多核苷酸杂交的反义寡核苷酸，从而抑制多核苷酸表达蛋白质，其中该蛋白质选自两栖生理素蛋白质和小窝蛋白。

仍然在本发明的另一方面，提供了调节需要的患者中细胞衰老的方法，其包括给患者施用有效量的甲基化试剂或脱甲基化试剂，其中该试剂使编码小窝蛋白质的多核苷酸的碱基甲基化或脱甲基化。

在本发明的其他方面，提供了鉴定影响细胞衰老的物质的方法，其包括：(a)在待测物质存在下培养细胞；(b)从细胞分离蛋白质；(c)将

分离的蛋白质与特异于参与细胞衰老的蛋白质的抗体接触，其中该蛋白质选自两栖生理素蛋白质和小窝蛋白；和(d)确定与抗体结合的分离的蛋白质的量。

仍然在本发明的其他方面，提供了鉴定影响细胞衰老的物质的方法，其包括：(a)在待测物质存在下培养细胞；(b)从细胞中分离 RNA；(c)将分离的 RNA 与编码参与细胞衰老的蛋白质的多核苷酸接触，其中该蛋白质选自两栖生理素蛋白质和小窝蛋白；和(d)确定与编码参与胞吞作用的蛋白质的多核苷酸杂交的分离的 RNA 的量。

在本发明的另一方面，提供了检测衰老细胞的试剂盒，其包括源自编码参与细胞衰老的蛋白质的多核苷酸的探针，其中蛋白质选自两栖生理素蛋白质和小窝蛋白。

仍然在本发明的另一方面，提供了鉴定细胞衰老的生物标记，其包括参与细胞衰老的蛋白质，其中该蛋白质选自两栖生理素蛋白质和小窝蛋白。

仍然在本发明的另一方面，提供了鉴定细胞衰老的含有参与细胞衰老的蛋白质的生物标记，其中蛋白质选自两栖生理素蛋白质和小窝蛋白。

在本发明的其他方面，提供了鉴定细胞衰老的生物标记，其含有编码参与细胞衰老的蛋白质的多核苷酸，其中该蛋白质包括两栖生理素蛋白质和小窝蛋白。

因此，本发明的一个目的是提供检测衰老细胞的方法。

本发明的另一目的是提供调节细胞衰老的组合物。

本发明的另一目的是提供调节需要的患者中细胞衰老的方法。

本发明的其他目的是提供鉴定影响细胞的衰老的物质的方法。

仍然是本发明的其他目的是提供检测衰老细胞的试剂盒。

仍然是本发明的另一目的是提供鉴定细胞衰老的生物标记。

本发明的其他目的和优点从下列详细描述结合附加的权利要求和附图将变得明了。

附图简述

图 1 的聚焦纤维照片代表在衰老细胞中胞吞作用的降低；

图 2 的聚焦纤维照片代表随着运铁蛋白在老龄和幼龄细胞中处理时间加长，运铁蛋白的内化；

图 3 的聚焦纤维照片显示脉冲追踪运铁蛋白吸收；

图 4 的聚焦纤维照片显示在 H_2O_2 或羟基脲诱导的衰老细胞中运铁蛋白的内化；

图 5 的照片显示蛋白质印迹分析与细胞衰老相关蛋白质表达的结果；

图 6 的照片显示蛋白质印迹分析在 H_2O_2 或羟基脲诱导的衰老的细胞中与细胞衰老相关蛋白质表达的结果；

图 7 的照片显示 RNA 印迹分析编码与细胞衰老相关蛋白质的 mRNA 的结果；

图 8 显示在实施例 VII 中所用的携带编码人两栖生理素-1 的 cDNA 的载体的基因图谱；

图 9 显示在实施例 VII 中构建的携带编码人两栖生理素-1 的 cDNA 的表达载体的基因图谱；

图 10 所示的照片代表用荧光显微镜观察到的图象以分析在显微注射细胞中的两栖生理素-1 表达；

图 11 代表携带显性负两栖生理素-1 基因的表达载体的基因图谱；

图 12 代表的聚焦纤维照片证实用显性负两栖生理素-1 基因处理的幼龄细胞的胞吞作用受到抑制；

图 13a 所示的照片代表蛋白质印迹对幼龄和中龄细胞中 Erk-1/2 激酶的激活（磷酸化）进行分析的结果；

图 13b 所示的照片代表蛋白质印迹对老龄细胞中 Erk-1/2 激酶的激活（磷酸化）进行分析的结果；

图 14 所示的照片代表蛋白质印迹对小窝蛋白亚型，即小窝蛋白-1、小窝蛋白-2 和小窝蛋白-3，在幼龄、中龄和老龄细胞中的表达进行分析的结果；

图 15 所示的照片代表免疫沉淀的结果，其证明在幼龄和老龄细胞中表皮生长因子受体(EGFR)和小窝蛋白-1 之间的相互作用；

图 16 的电子显微照片显示幼龄和老龄细胞中的小窝结构；

图 17 代表携带实施例 XV 中构建的小窝蛋白-1 cDNA 的表达载体的基因图谱；

图 18 代表的照片显示对用小窝蛋白-1 cDNA 转化的幼龄细胞进行蛋白质印迹分析的结果；

图 19 代表的聚焦纤维照片表示小窝蛋白-1 的表达被反义寡核苷酸急剧降低；

图 20 的照片表示对反义寡核苷酸转染到小窝蛋白-1 后的 Erk-1/2 激活进行蛋白质印迹分析的结果；

图 21 的聚焦纤维照片代表在幼龄和老龄细胞中用表皮生长因子(EGF)刺激后 Erk-1/2 的激活和定位；

图 22 的聚焦纤维照片显示在小窝蛋白-1 下调后，即在将反义寡核苷酸转染到小窝蛋白-1 之后，在幼龄和老龄细胞中用 EGF 刺激后 Erk-1/2 的激活和定位；

图 23a 的照片代表对用脱甲基化试剂 5-杂氮-脱氧胞苷处理的幼龄细胞进行与衰老相关的β-半乳糖苷活性染色的结果；以及

图 23b 所示的照片代表对用脱甲基化试剂 5-杂氮-脱氧胞苷处理的幼龄细胞进行蛋白质印迹分析的结果。

发明详述

本发明主要涉及调节细胞衰老的核酸和蛋白质。正如实施例中所证明，本发明人已经发现两栖生理素和小窝蛋白以各自不同的方式对细胞衰老负责。

通过网格蛋白包被的小泡进行受体介导的胞吞作用的过程是由几个步骤组成的，其包括补充网格蛋白包被和有被芽的分裂(Schmid, S.L. 生物化学年评，66:511-548(1997))。在配体和受体结合之后，如表皮生长因子(下文中称为“EGF”)，受体酪氨酸激酶磷酸化网格蛋白，依次可以提供两栖生理素的 Src-同源性-3(SH3)区的结合位点(Slepnev, V.I.等，科学，281:821-824(1998); Wang, L.H.等，生物化学杂志，270:10079-10083(1995); 和 Ramjaun, A.R.等，神经化学杂志，70:2369-2376(1998))。虽然它的准确的作用机制还不清楚，但人们认为两栖生理素-1 参与了胞吞的芽的颈部的补充和寡聚(Schmid, S.L. 生物化学年评，66:511-548(1997)；和 Takei, K.等，自然细胞生物学，133-139(1999))。两栖生理素-1 桥接了 AP2/网格蛋白包衣和发动蛋白-1，从而产生了内体小泡(Slepnev, V.I.等，科学，281:821-824(1998)；Shupliakov, O.等，科学， 276:259-263(1997)；McMahon, H.T.等, FEBS Lett., 413:319-322(1997); David, C.等，美国国家科学院院刊， 93:331-335(1996); 和 Urrutia, R.等，美国国家科学院院刊，94:377-384(1997))。两栖生理素的羧基末端区补充了 GTPase 发动蛋白，拧下了有被芽(David, C.等，美国国家科学院院刊，93:331-335(1996)；和 Urrutia, R.等，美国国家科学院院刊，94:377-384(1997)。破坏两栖生理素与发动蛋白或网格蛋白和 AP-2 的相互作用抑制了网格蛋白介导的胞吞作用(Slepnev, V.I.等，科学，281:821-824(1998)；Shupliakov, O.等，科学，276:259-263(1997)；和 Wigge, P.等，现代生物学，7:554-560(1997))。这些发现表明，两栖生理素可以作为将胞吞小泡的网格蛋白介导的芽和发动蛋白介导的小泡分裂相偶联的已调节的衬垫蛋白质（liner protein）。另外，已经有报道，两栖生理素有几个亚型，两栖生理素-

2 也有 SH3 区，并如两栖生理素-1 一样与发动蛋白具有结合亲和力。

小窝是质膜的囊状内陷，直径在 50-100nm, 参与了胞吞作用如转胞吞作用和 ptocytosis 和信号转导(Engelman, J.A.等, FEBS Lett., 428:205(1998))。小窝蛋白为 21-24kDa 整合的膜蛋白，是体内小窝蛋白膜的主要结构成分。小窝蛋白-1 或-3 基因在没有小窝蛋白的哺乳动物细胞中的稳定表达诱导了小窝结构的形成(Lipardi, C.等, 细胞生物学杂志，140:617(1998))。已经发现了小窝蛋白在体内有几个亚型。小窝蛋白-1 是小窝结构的关键成分。小窝蛋白-2 在大多数细胞类型中普遍表达，假设性在基底外侧定位的小窝中形成杂合寡聚体(Scheiffele, P.等, 细胞生物学杂志，140:795(1998))。已经有报道，小窝蛋白-3 的表达限制于横纹肌肉细胞中(Tang, Z.等，生物化学杂志，271:2255(1996))。

I. 检测衰老细胞的方法和鉴定影响细胞衰老的物质的方法

本方法利用了参与胞吞作用的蛋白质，如两栖生理素蛋白质和小窝蛋白。

在本方法中，指示细胞衰老的信号是通过测量细胞中两栖生理素蛋白质水平的下降或通过测量细胞中小窝蛋白水平的提高来检测的。

术语“衰老”用于本文中与“老龄化”有相同的意思。术语“老龄细胞”用于本文中与“衰老细胞”有相同的意思。除非另有定义，用于本文的所有技术和科学术语的意思与本发明所属领域中的普通技术人员的一般理解相同。例如，用于本文的术语可以在下面的文献中找到，Benjamin Lewin, Genes VII, 牛津大学出版社(2000)出版；和 Kendrew 等, 分子生物学百科全书，Blackwell 科学有限公司出版(1994)。

根据优选的实施方案，细胞起源于哺乳动物细胞如人细胞。

用于本发明的两栖生理素可以选自如上所述的两栖生理素亚型。优选地，两栖生理素蛋白质是两栖生理素-1，已知是如上提到的主要亚型。另外，利用的小窝蛋白可以选自小窝蛋白-1、小窝蛋白-2 和小窝蛋白-3。优选地，利用的小窝蛋白是小窝蛋白-1，也已知是如上所述的主要亚型。

在利用针对两栖生理素或小窝蛋白的抗体的本发明方法中，如本领域的技术人员已知的方法可以得到该抗体(抗体：实验室手册，冷泉港实验室(1988))。该抗体可以是多克隆或单克隆抗体。单克隆抗体可以利用熟知的技术容易地制备，如美国专利号 4,196,265 中举例的那些技术。确定与抗体结合的分离蛋白质的量可以根据本领域技术人员已知的方法进行，如放射免疫测定和酶联免疫吸附测定。这些方法通常基于标记或标志的检测，如放射性、荧光、生物学或酶标志或标记。

在这一方法的优选实施方案中，该方法是通过蛋白质印迹方法来进行的。蛋白质印迹方法的一般程序公开在 Peter B. Kaufma 等, 生物学和医学，分子和细胞学方法，108-121，CRC 出版社中。本发明的蛋白质印迹优选地包括(a)溶解待测的细胞样品；(b)从溶解的细胞中制备蛋白质；(c)在含有 SDS 和 2-巯基乙醇的溶液中变性制备的蛋白质；(d)进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳；(e)将凝胶上的蛋白质转移到硝酸纤维素(下文称为“NC”) 膜上；(f)将 NC 膜上的蛋白质与针对两栖生理素或小窝蛋白、优先是两栖生理素-1 或小窝蛋白-1 的初级抗体反应；(g)将初级抗体与酶催化比色反应结合的次级抗体反应；(h)通过加入(g)中的酶的底物诱导比色反应；和(i)测量酶(g)的显色的强度。

优选的比色反应的酶包括但不限于碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶和辣根过氧化物酶。如果利用碱性磷酸酶，则溴氯吲哚磷酸(BCIP)、氮蓝四唑(NBT)和 ECF 可以用作底物，在利用辣根过氧化物酶的情况中，氯萘酚、氨乙基咔唑、二氨基联苯胺和鲁米诺可以用作底物。

正如实施例中所述，本发明人已经发现，细胞中的两栖生理素的水平在衰老阶段剧烈下降，但对于小窝蛋白则是相反的情况。所以，本方法可以定性地进行。例如，可发现检测两栖生理素的蛋白质印迹带的强度和厚度剧烈地降低到肉眼能够检测的程度；在蛋白质印迹检测小窝蛋白的情况中，可发现得到的带的强度和厚度剧烈地增加。结果，比较来自衰老细胞和来自幼龄细胞的蛋白质印迹带，可以容易地检测衰老。

另外，本方法可以定量的方式进行。例如，采用密度计可把从蛋白质印迹得到的带转化成定量的数据。在分析 40μg 蛋白质的特定的实施例中，如果在测试细胞中两栖生理素-1 的表达水平比幼龄细胞少 45 倍，则可以认为被测细胞是衰老的。

本方法利用编码参与胞吞作用的蛋白质如两栖生理素蛋白质和小窝蛋白的多核苷酸。

在这一方法中，通过测量细胞中编码两栖生理素蛋白质的多核苷酸的水平的下降或测量细胞中编码小窝蛋白的多核苷酸的水平的增加来检测指示细胞衰老的信号。

根据优选的实施方案，细胞起源于哺乳动物的细胞如人的细胞。优选地，该多核苷酸是一种编码两栖生理素-1 或小窝蛋白-1 的多核苷酸。优选地，用于本方法的多核苷酸是 gDNA(基因组 DNA)、cDNA 和 mRNA。

在这一方法优选的实施方案中，该方法可通过 RNA 印迹方法进行。RNA 印迹方法的一般程序公开在 Peter B. Kaufma 等, 生物学和医学，分子和细胞方法，102-108，CRC 出版社中。本发明的 RNA 印迹优选地包括如下步骤：(a)从待测细胞中制备 RNA；(b)用已制备的 RNA

进行电泳；(c)将 RNA 转移到尼龙或 NC 膜上；(f)将已转移的 RNA 与互补于两栖生理素 mRNA 或小窝蛋白 mRNA，优先与互补于两栖生理素-1 mRNA 或小窝蛋白-1 mRNA 的放射性标记的寡核苷酸探针杂交；和(g)测量得到的带的强度。

正如实施例中所述，本发明人已经发现，细胞中的两栖生理素 RNA 的水平在衰老期剧烈地下降，而对于小窝蛋白则相反。所以，本方法可以定性地进行。例如，可以发现，用于检测两栖生理素 RNA 的 RNA 印迹带的强度和厚度剧烈地下降到肉眼能够观察的程度；在用于检测小窝蛋白 RNA 的 RNA 印迹的情况中，可以发现，得到的带的强度和厚度剧烈地增加。结果，比较来自衰老细胞和来自幼龄细胞的 RNA 印迹的带，可以方便地检测衰老。

另外，本发明可以定量的方式进行。例如从 RNA 印迹得到的带采用密度计可转化成定量的数据。在分析 50μg 两栖生理素-1 RNA 的特定的实施例中，如果被测细胞的带的强度比幼龄细胞小 15 倍，则可以认为被测细胞是衰老了。

II. 调节细胞衰老的组合物

本发明调节细胞衰老的组合物包括能够调节细胞衰老的生物分子。生物分子包括：(a)蛋白质，如两栖生理素蛋白质和小窝蛋白；和(b)多核苷酸，如一种编码两栖生理素蛋白质或小窝蛋白的多核苷酸。另外，生物分子包括能够与编码两栖生理素蛋白质或小窝蛋白的多核苷酸杂交的反义寡核苷酸。同时，本发明的组合物包括甲基化试剂或脱甲基化试剂，以便使编码小窝蛋白的多核苷酸的碱基甲基化或脱甲基化。

如上所述，可以想象，蛋白质是可以直接送递的，优选的实施方案包括提供编码两栖生理素或小窝蛋白的多核苷酸。

根据优选的实施方案，细胞起源于哺乳动物的细胞如人细胞。优选地，参与胞吞作用的蛋白质是两栖生理素-1 或小窝蛋白-1。

在含有多核苷酸的组合物中，优选地，多核苷酸是 gDNA 或 cDNA，并且通过真核细胞的表达载体携带。编码两栖生理素-1 的多核苷酸优选地包括，编码 SEQ ID NO:2 代表的氨基酸序列的核苷酸序列，并且更优选包括对应于 SEQ ID NO:1 代表的核苷酸序列的第 111-2195 位核苷酸的核苷酸序列。编码小窝蛋白-1 的多核苷酸优选包括编码 SEQ ID NO:4 代表的氨基酸序列的核苷酸序列，更优选包括对应于 SEQ ID NO:3 代表的核苷酸序列的第 26-559 位核苷酸的核苷酸序列。

用于本发明的表达载体在真核宿主，优选地在哺乳动物细胞，更优选地在人细胞中表达外源基因。表达载体中的启动子可以来自哺乳动物细胞的基因组(例如金属硫蛋白启动子)或来自哺乳动物病毒的启动子(例如腺病毒后启动子、牛痘病毒 7.5k 启动子)。另外，还有可能并且理想的是利用通常与所需基因序列相关的启动子或控制序列，条件是这样的控制序列与宿主细胞系统是兼容的。可以利用许多以病毒为基础的表达系统，例如通常利用的启动子来源于多形瘤、腺病毒 2 和最常见的猿猴病毒 40(SV40)。在转录单位中掺入适当的聚腺苷酸化位点是需要的。用于本发明的市售载体的例子包括 pcDNA 3(Invitrogen; 含有巨细胞病毒启动子和聚腺苷酸化信号)、pSI(Promega；含有 SV 40 启动子和聚腺苷酸化信号)、pCI(Promega；含有巨细胞病毒启动子和聚腺苷酸化信号)和 pREP7(Invitrogen；RSV 启动子和 SV 40 聚腺苷酸化信号)。

另外，在含有编码两栖生理素或小窝蛋白的多核苷酸的组合物中，可以利用为基因治疗而设计的病毒载体送递该多核苷酸。例如，送递系统包括但不限于(a)腺病毒载体(Stratford-Perricaudet 和 Perricaudet, 人基因的转移，Cohen-Haguenauer 和 Boiron, Editions John Libbey Eurotest, France, 51-61(1991))；和 Stratford-Perricaudet 等，Hum.

Gene Ther., 1:241-256(1991)；(b)腺伴随病毒载体(LaFace 等，病毒学，162:483-486(1998)；Zhou 等，实验血液学，21:928-933(1993)；和 Walsh 等，临床研究杂志，94:1440-1448(1994)；和(c)逆转录病毒载体，如莫络尼鼠白血病病毒的改造变体(Kasahara 等，科学，266:1373-1376(1994))。

在含有反义寡核苷酸的本发明组合物中，反义寡核苷酸可以在细胞内的条件下与靶 DNA 或 RNA 杂交。用反义寡核苷酸靶击双链 DNA 导致三链螺旋的形成；靶击 RNA 导致双链螺旋的形成。可以设计反义寡核苷酸结合靶基因的启动子和其他控制区、外显子和内含子。用于本发明的反义寡核苷酸可以基本上与靶多核苷酸互补。即，反义构建体可以与靶基因有一些碱基错配。更优选地，反义寡核苷酸与编码小窝蛋白质，优先与编码小窝蛋白-1 的多核苷酸杂交。最优选地，反义寡核苷酸与小窝蛋白-1 mRNA 的翻译起始区杂交。

在本发明中含有甲基化试剂或脱甲基化试剂，该试剂调节小窝蛋白基因的碱基的甲基化水平。正如实施例中所述，具有较少甲基化水平的小窝蛋白基因展示了更大的表达水平。在一个优选的实施方案中，待甲基化或脱甲基化的小窝蛋白基因是小窝蛋白-1 基因。更优选地，修饰的区域是小窝蛋白-1 基因的启动子，以及最优选地，修饰的区域是来自小窝蛋白-1 基因的启动子的 CpG 岛。用于本发明的甲基化试剂的例子包括但不限于甲基氧化偶氮甲醇乙酸酯（methylazoxymethanol acetate），temozolomide 和 N-甲基-N-亚硝基脲。用于本发明的脱甲基化试剂的非限制性例子包括 5-氮杂-脱氧胞苷、5-氮杂胞苷、6-氮杂胞苷和 8-氮杂鸟嘌呤。

作为调节细胞衰老的组合物，本发明提供含有有效量的显性负两栖生理素-1 基因的组合物。已知显性负两栖生理素-1 基因封闭了两栖生理素-1 的功能(Shupliakov, O.等，科学，276:259(1997)；和 Wigge P.，现代生物学，7:554(1997))。用显性负两栖生理素-1 基因处理导致了如

实施例中所述的细胞衰老。根据优选的实施方案中，显性负两栖生理素-1 基因是编码多肽的多核苷酸，所述多肽包括 SEQ ID NO:2 代表第250-588 位的氨基酸序列。

III. 调节细胞衰老的方法

在本发明的方法中，有效量的涉及两栖生理素或小窝蛋白的生物分子通常是给细胞施用的。具体而言，根据下面的方法，可以在体内或体外导入编码两栖生理素或小窝蛋白或其反义寡核苷酸的多核苷酸：(a)显微注射(Capecchi, M.R., 细胞，22:479(1980)); (b)磷酸钙共沉淀(Graham, F.L.等, 病毒学，52:456(1973))；(c)电穿孔(Neumann, E.等, EMBO J., 1: 841(1982)); (d)脂质体介导的转染(Wong, T.K.等, 基因，10:87(1980)); (e)DEAE 葡聚糖处理(Gopal, 分子细胞生物学，5:1188-1190(1985)); 和(f)颗粒炸弹(Yang 等, 美国国家科学院院刊，87:9568-9572(1990))。

根据优选的实施方案，利用的细胞来自于哺乳动物细胞，更优选的是人细胞。优选地，施用的蛋白质、多核苷酸和反义寡核苷酸涉及两栖生理素-1 或小窝蛋白-1。优选地，施用的多核苷酸是 gDNA 或 cDNA。更优选地，在真核细胞的表达载体上携带施用的多核苷酸。在利用反义构建体的方法的优选实施方案中，反义寡核苷酸基本上是与编码小窝蛋白、更优选的是与编码小窝蛋白-1 的基因互补。最优选的实施方案包括，反义寡核苷酸与小窝蛋白-1 mRNA 的翻译起始区杂交。

在本方法中，利用甲基化试剂或脱甲基化试剂，该试剂调节小窝蛋白基因的碱基的甲基化水平。在优选的实施方案中，待甲基化或脱甲基化的小窝蛋白基因是小窝蛋白-1 基因。更优选地，修饰的区域是小窝蛋白-1 基因的启动子，最优选地，修饰的区域是来自小窝蛋白-1 基因的启动子的 CpG 岛。用于本发明的甲基化试剂的例子包括但不限于甲基氧化偶氮甲醇乙酸酯、temozolomide 和 N-甲基-N-亚硝基脲。

用于本发明的脱甲基化试剂的非限制性例子包括 5-氮杂-脱氧胞苷、5-氮杂胞苷、6-氮杂胞苷和 8-氮杂鸟嘌呤。

在 I、II 和 III 之间共同叙述简写了，以便避免这一说明书的复杂性，导致不适当的重复。

IV. 试剂盒和生物标记

如上所述，本发明提供了检测衰老细胞的试剂盒。检测衰老细胞需要的所有必需材料和试剂可以一起组装成试剂盒。利用的探针可以用于与从待测细胞中分离的 DNA 或 RNA 杂交。另外，利用的探针可以是在本领域技术人员已知的任何分子生物学分析如 PCR 和 RT-PCR 中所用的引物。还可包括的是适于扩增核酸的酶，如 Taq 聚合酶，dNTP 混合物和缓冲液，以提供扩增所必需的反应混合物。

在优选的实施方案中，探针起源于编码两栖生理素-1 蛋白质或小窝蛋白的多核苷酸。优选地，该探针固定于固相支持物上。在本发明的试剂盒中适于利用的固相支持物是本领域的技术人员已知的，包括玻璃、塑料、多聚体、金属、准金属、陶瓷和有机物。根据更优选的实施方案，本发明提供了包括一批来源于编码两栖生理素-1 蛋白质或小窝蛋白-1 的多核苷酸的探针的试剂盒。含有固相支持物的微阵的常用技术已经公开在许多出版物中，如 WO 89/10977、美国专利号 5,202,231、5,002,867 和 5,143,854。

根据本发明的优选的实施方案，该试剂盒另外包括检测探针是否在的标记。该标记允许检测探针和从待测样品中分离的核苷酸之间的杂交。最常见的标记是放射性物质，如 ^{3}H、^{14}C 和 ^{32}P。

本发明提供了用于鉴定细胞衰老的生物标记。在优选的实施方案中，适于这一发明的蛋白质或多核苷酸起源于两栖生理素-1 或小窝蛋白-1。

下面的特异的实施例旨在用来说明本发明，不应看成限制如附加的权利要求书所限定的本发明的范围。

实施例 I：细胞培养

I-1：人包皮（foreskin）成纤维细胞的培养

根据 Boyce 和 Ham 提供的方法(Boyce ST. and Ham RG., J. Invest. Dermato., 81:33-40(1983))，分离和培养包皮成纤维细胞，步骤如下：首先，从 7 岁大的朝鲜男孩中得到包皮，剥离得到片，然后，在 10ml 含有 0.25%胶原酶的 Hank 盐溶液(Gibco BRL)中加入包皮片。37℃下在 CO_2 控制(5%)的培养箱中温育 90 分钟之后，上皮和真皮相互分离。向分离的真皮中加入 1ml 胰蛋白酶溶液(0.25%)，并将得到的溶液加入到 10ml 含有 100μg/ml 链霉素和 100 单位/ml 青霉素的 DMEM(Dulbecco 修饰的 Eagle 培养基：Sigma)中，接着在 37℃温育 10 分钟。用 10ml 的 PBS 洗涤生成的包皮成纤维细胞，和在 DMEM (用 10%FBS 和抗生素补充)中连续如下传代：将培养箱维持在 5%CO_2 和 37℃，每 3 天更新 DMEM，保持亚汇合(约 80-90%)，并以 1:4 的比例进行传代培养。用小于 25 个群体倍增培养的细胞视为早衰细胞，它们是高度增殖的，而将超过 60 个群体倍增的细胞定义为衰老细胞，它们显示了推迟的群体倍增时间(超过 3 星期)。

I-2：胎盘的肺成纤维细胞的培养

胎盘的肺成纤维细胞 IMR-90 是从 ATCC(CCL-186)购买的。以和上面相同的方法进行 IMR-90 的培养。

实施例 II：诱导细胞衰老

II-1：用 H_2O_2 诱导细胞衰老

在实施例 I-1 中传代培养的成纤维细胞 PDL 是 16，将其放置于培养平板上，在培养箱中(37℃、5%CO_2 和加湿)使细胞周期停滞在 G1 期一周。细胞周期停滞证明如下：在用冷乙醇固定细胞后，在室温下

用 PI 染色溶液(含有 50μg/ml 的核糖核酸酶 A 和 50μg/ml 碘化 propinium 的 PBS)将细胞染色 30 分钟。然后，利用 FACS(荧光激活的细胞分类器)，细胞周期通过观察 DNA 表型，即 2n 或 4n 得到确认。在 G1 期的细胞显示了 2n 的 DNA 表型。

用 400μM H_2O_2 处理停滞在 G1 期的成纤维细胞，然后温育 3 小时。接着用 10ml PBS 洗涤。然后，以 1:4 的比例和在细胞培养的正常条件下(37℃、5%CO_2 和加湿)传代培养细胞，连续地进行细胞培养。在处理 7 天后，利用如实施例 III 中所述的与衰老相关的β-半乳糖苷酶活性染色，确定细胞的衰老。

II-2. 用羟基脲诱导细胞的衰老

在实施例 I-1 中传代培养的成纤维细胞 PDL 是 16，将其放置于含有 DMEM 的培养平板上，并在培养箱中(37℃、5%CO_2 和加湿)培养 14 小时。然后，用 400μM 羟基脲处理成纤维细胞，然后连续温育。每 3 天加入新鲜的 400μM 的羟基脲更新培养基。在处理后 14 天，利用实施例 III 中所述的与衰老相关的β-半乳糖苷酶活性染色确定细胞的衰老。

实施例 III：衰老相关的β-半乳糖苷酶活性染色

根据 Dimri 等的方法(Dimri GP 等，美国国家科学院院刊，92:9363(1995))进行与衰老相关的β-半乳糖苷酶活性染色(下文中称为“SA β-gal 活性染色”)：用 10ml 的 PBS 洗涤半汇合的成纤维细胞两次，并用 2%低聚甲醛的 PBS 在室温下固定 5 分钟。PBS 洗涤后，用 SA β-gal 活性染色溶液(1mg/ml X-gal, 40mM 柠檬酸/磷酸钠缓冲液、pH 6.0，5mM 亚铁氰化钾/高铁氰化钾，150mM NaCl 和 2mM $MgCl_2$)在 37℃温育细胞 4 小时。用相差显微镜观察幼龄和老龄的人成纤维细胞。观察的结果是，人成纤维细胞显示 PDL 50、PDL 65 的 IMR 90、用 H_2O_2 处理后 10 天的细胞以及用羟基脲处理后 14-20 天的细胞的β-半乳糖苷酶活性，这证明进入了细胞衰老。

实施例 IV：评估胞吞作用的变化

IV-1: 在衰老细胞中观察胞吞作用的降低

为了研究衰老细胞中受体介导的胞吞作用的功能变化，观察了运铁蛋白的内化。在盖玻片上铺成纤维细胞，并在培养箱中温育(37℃、5%CO_2 和加湿)，接着用 25μg/ml 的四甲基罗丹明-结合的人运铁蛋白(分子探针)处理 5 分钟。在用 10 毫升 PBS 洗涤后，细胞用 4%低聚甲醛的 PBS 室温下固定，然后，用 DAPI (Sigma Aldrich) 染色细胞核。用聚焦显微镜(Biorad, #MRC1024) 检测荧光运铁蛋白的内化，表示在图 1 中。在图 1 中，A 组代表幼龄(PDL 20)成纤维细胞和衰老的成纤维细胞(PDL 54) 和 B 组代表 IMR 细胞(分别为 PDL 32 和 PDL 68)。正如图 1 中证明，幼龄成纤维细胞和 IMR 细胞容易吸收荧光运铁蛋白，并在核周区，内化的运铁蛋白观察为典型的标点式新月型形状。相反，衰老细胞如早衰细胞一样不能有效吸收运铁蛋白。

IV-2：随处理时间增加观察运铁蛋白的内化

如前所述，用 25μg/ml 四甲基罗丹明-结合的人运铁蛋白处理成纤维细胞 10、20、40 或 60 分钟；并把实验结果表示在图 2 中。在图 2 中，组 Y、M 和 O 分别代表幼龄成纤维细胞(PDL 24)、中龄成纤维细胞(PDL 28)和老龄成纤维细胞(PDL 54)。正如图 2 所示，具有 PDL 24 和 PDL 38 的细胞有效地吸收荧光运铁蛋白，并且在核周区，10 分钟处理中观察到了内化的运铁蛋白，其随着处理时间的增加而增加，从而得到更大的荧光强度。与此相反，老龄成纤维细胞甚至在 60 分钟处理后也不吸收运铁蛋白。

IV-3：脉冲追踪运铁蛋白吸收

在 IMR 90 细胞上脉冲 25μg/ml 的罗丹明-结合的运铁蛋白 5 分钟，然后，追踪 0、5 和 10 分钟。在如上所述的固定后，用聚焦显微镜检测荧光运铁蛋白的内化(参见图 3)。在图 3 中，组 Y、M 和 O 分别代表幼龄(PDL 26)、中龄(PDL 48)和老龄细胞(PDL 72)。正如图 3 中所示，

幼龄细胞有效地吸收运铁蛋白，并仅在 5 分钟内就定位于核周区，然后在追踪 10 分钟后，快速降解运铁蛋白。在追踪 10 分钟后发现，PDL 48 细胞推迟和限制了运铁蛋白的吸收。PDL 72 细胞随着追踪时间流逝几乎不能吸收运铁蛋白。

IV-4：在人工诱导的衰老细胞中观察降低的胞吞作用

用如上所述的 25μg/ml 的罗丹明结合的运铁蛋白处理实施例 II 中人工诱导的衰老细胞，用聚焦显微镜检测荧光运铁蛋白的内化(参见图 4)。如图 4 所示，不仅通过连续传代的天然存在的衰老细胞而且由 H_2O_2 或羟基脲(标记“＋”)人工诱导的衰老细胞显示了受体介导的胞吞作用的功能降低。

总而言之，本发明人已经发现，衰老的成纤维细胞显示了胞吞作用的功能显著降低，所以不能吸收各种配体如运铁蛋白。

实施例 V：对参与受体介导的胞吞作用的蛋白质的表达进行分析

为了鉴定衰老细胞中受体介导的胞吞作用如此变化的分子机制，参与受体介导的胞吞作用的几个蛋白质的表达水平是通过蛋白质印迹实验来检查的。

首先，总的细胞溶解物是利用溶解缓冲液(1% Triton X-100，0.5% NP-40，50mM Tris、pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 5μg/ml 抑酶肽，5μg/ml 亮抑酶肽，1mM $NaVO_4$ 和 1mM NaF)从亚汇合的早、中和晚传代的细胞中提取的，并用超声波短暂破碎，然后，以 14000xg 离心 10 分钟，收集上清液。采用如 Bradford 方法对上清液进行蛋白质定量(Bradford, M., Anal. Biochem. 72: 248-254(1976))，并在 5×SDS 的样品缓冲液(60mM Tris-Cl、pH6.8，25%甘油，2%SDS，14.4mM 2-巯基乙醇和 0.1%溴酚兰)中将 40μg 的蛋白等同物煮沸 5 分钟。在 8%的聚丙烯酰胺凝胶上，利用电泳试剂盒(Biorad)电泳细胞溶解物(10-15 μg 蛋白质等同物)，然后利用转移试剂盒转移到硝酸纤维

素膜上。在室温下用含有5%的无脂奶粉(Difco)的TTBS(带有Tween 20的Tris缓冲盐)封闭印迹1小时。室温下用含5%的无脂奶粉的TTBS中的各个初级抗体免疫印迹斑点（blot）1小时，以TTBS洗涤3次，再用辣根过氧化物酶结合的抗小鼠次级抗体(Jackson 免疫研究实验室)温育。在初级抗体中，从Transduction Laboratories购买抗发动蛋白抗体，抗-α-衔接蛋白，抗-β-衔接蛋白和抗网格蛋白重链抗体，针对两栖生理素-1的单克隆抗体由Chungbuk国立大学（Chungbuk National University）的Kim博士制备(Jin, Y., Kim等(待出版)，抗两栖生理素的单克隆抗体的生产和鉴定，Exp. Mol. Med.)，以及抗磷酸酪氨酸（phosphotyrosin）抗体和抗运铁蛋白受体抗体是Santa Cruz生物技术公司的。由增强的化学发光系统可最后观察到信号(ECL 试剂盒，Amersham Pharmacia Biotech)，它们在图5中找到。

正如图5中证明的，只有两栖生理素-1，而不是其他测试的胞吞蛋白质在衰老细胞中显著降低。在包皮成纤维细胞和IMR 90细胞中均观察到两栖生理素-1蛋白质表达的独特降低。另外，由H_2O_2或羟基脲(标记“＋”)诱导的衰老细胞给出了如图5中所示的相同结果(参见图6)。

这些结果表明，细胞衰老过程伴随着两栖生理素-1的下调。

实施例VI:Northern分析编码参与受体介导的胞吞作用的蛋白的mRNA

实施例V中的分析表明在衰老细胞中两栖生理素-1的水平降低，为了研究该现象的准确机理，使用了RNA印迹方法。具体方法如下：

使用酸性硫氰酸胍－苯酚－氯仿，从实施例I的人成纤维细胞中提取RNA，与甲醛样品缓冲液（5×MOPS、17.5%甲醛和50%甲酰胺）混合，然后使用电泳试剂盒（Hoefer）在1%的琼脂糖凝胶上进行电泳。电泳后，将RNA转移到硝酸纤维素膜上，并使用全自动紫外交联仪（Stratagen）使RNA交联于膜上。然后，使用P^{32}标记的探针（包含两栖生理素-1 cDNA的第111-1116位碱基）进行杂交，结果获得放射

自显影（参见图 7）。在图 7 中，组 Y、M 和 O 分别代表了 PDL 27、PDL 36 和 PDL 60 成纤维细胞。图 7 阐明了两栖生理素 mRNA 的水平随着衰老的进程而降低。

这些结果表明细胞的衰老过程伴随着两栖生理素-1 在转录水平的下调。

实施例 VII：两栖生理素-1 基因的克隆

编码全长人两栖生理素-1 的 cDNA，具有 SEQ ID NO:1 表示的核苷酸序列，携带该 cDNA 的载体得自韩国 Chungbuk 国立大学。在构建此载体时，将该 cDNA 插入到 pGEX-2T 载体（Pharmacia）的 BamHI 和 EcoRI 限制性位点之间，因此两栖生理素-1 和谷胱甘肽-S-转移酶以融合的形式表达。图 8 显示了携带编码人两栖生理素-1 的 cDNA 的最终载体的遗传图谱。使用 PCR 方法扩增了全长 cDNA，所用引物为：5'-AACTGTCCACCATGGCCGACATCAAGACGGGC-3' 和 5'-GGATCCCTAATCTAAGCGTCGGGT-3'。PCR 扩增使用 Pyrobest Taq 聚合酶（Takara），共进行 30 个循环，每个循环的温度设置为：55℃、30 秒（退火），72℃、1.5 分钟（延伸）以及 92℃、30 秒（变性）。将扩增的 cDNA 克隆到 pT7 blue 载体（Novagen）中，并测定其碱基序列。在用 HindIII 和 BamHI 消化后，把该 cDNA 亚克隆到 pcDNA3 载体（Invitrogen：含有巨细胞病毒的启动子和多聚腺苷化信号）中，以便通过显微注射将扩增的两栖生理素-1 的 cDNA 引入成纤维细胞。图 9 显示了含有两栖生理素-1 cDNA 的 pcDNA3 的遗传图谱。

实施例 VIII：在衰老细胞中使用两栖生理素-1 基因恢复胞吞功能

VIII-1：两栖生理素-1 基因的显微注射

将实施例 I 中的衰老成纤维细胞（PDL 58）置于盖玻片上，加入含有 FBS 的 DMEM，于培养箱中（37℃、5% CO_2 和加湿）温育 24 小时。然后将 10^{-14} 升实施例 VII 中克隆在 pcDNA3 中的两栖生理素-1 基因（10 ng/ml）和 10^{-14} 升兔 IgG（Sigma，5 mg/ml），通过显微注射

注入衰老成纤维细胞的核内。载体用显微注射缓冲液（50mM HEPES、pH7.2，100mM KCl，50mM $NaPO_4$）稀释到 10ng/ml。使用 transjector 5426（Eppendorf）和显微操作仪（micromanipulator）（Eppendorf）将稀释的载体显微注射到细胞核内。

VIII-2：两栖生理素-1 在显微注射细胞中的表达分析

使用双免疫荧光染色法对两栖生理素-1 在显微注射细胞中的表达进行分析。显微注射后，细胞在不含 FBS 的 DMEM 中培养 24 小时，再用含 3.7%低聚甲醛的磷酸缓冲液固定 10 分钟，然后用 0.3% Triton X-100 的磷酸缓冲液于室温处理 10 分钟以增加通透性。细胞与抗两栖生理素-1 抗体和 FITC 结合的抗大鼠 IgG 抗体（Jackson 实验室，稀释 100 倍）于 37℃ 按序温育 1 小时，然后再与若丹明（rhodamine）结合的抗兔 IgG 抗体（Jackson Laboratories，稀释 100 倍）于 37℃ 温育 1 小时。使用荧光显微镜（Zeiss， Axiovert25， CFL451210）观察图象（参见图 10）。如图 10 所示，抗兔 IgG 给出了由若丹明发出的红色荧光，而两栖生理素-1 则由次级抗体中的 FITC 发出的绿色荧光所确定。在细胞质中发现了证明两栖生理素-1 存在的绿色荧光。

所以，这些结果表明在实施例 VIII-1 的显微注射细胞中，两栖生理素-1 蛋白得到了表达。

VIII-3：在衰老细胞中恢复胞吞功能的分析

显微注射细胞在不含 FBS 的 DMEM 中于培养箱（37℃、5% CO_2 和加湿）中培养 24 小时。然后，细胞用 125 ng/ml 四甲基若丹明结合的运铁蛋白处理 30 分钟，用 10 ml 磷酸缓冲液清洗，再用 10 ml 含 4%甲醛的磷酸缓冲液固定 10 分钟。参照实施例 VIII-2 中所述的方法进行免疫荧光染色。利用荧光显微镜（Zeiss，Axiovert 100）分析显微注射细胞和摄入的运铁蛋白。结果概括于表 1 中。

表 1

DNA[1]	抗体[2]	显微注射的细胞			未显微注射的细胞		
		Tf[3]	Total[4]	Ave[5](%)	Tf	Total	Ave(%)
PcDNA 3	抗兔 IgG 抗体	1	12	7.50	4	32	11.09
		1	15		3	31	
Ap-1[6] 基因 + pcDNA 3	抗兔 IgG 抗体	1	12	7.50	18	46	36.81
		1	15		10	29	
	抗两栖生理素-1 抗体	1	12	10.42	18	37	48.65
		2	16				

[1]被显微注射的 DNA；[2] 用于分析显微注射细胞的抗体；[3] 运铁蛋白；[4] 总细胞数；[5] 平均值；以及 [6] 两栖生理素-1。

从表 1 可以看出，与用 pcDNA3 显微注射的对照细胞相比，用携带两栖生理素-1 基因的 pcDNA3 显微注射的细胞表现出高得多的运铁蛋白摄取活性。也就是说，通过引入两栖生理素-1 cDNA，衰老细胞的胞吞活性急剧增加。这些结果成功地证明了两栖生理素-1 对于衰老细胞功能性胞吞作用的恢复是必需的，因而对调节细胞的衰老也是必需的。

实施例 IX：显性负两栖生理素-1 基因的克隆

已知显性负两栖生理素-1 基因能够阻断两栖生理素-1 的功能（Shupliakov, O.等，Science, 276:259(1997); 和 Wigge, P.，Curr. Biol., 7:554(1997)）。使用 PCR 方法扩增了显性负两栖生理素-1 基因，以两栖生理素-1 cDNA 为模板，使用特异引物扩增了编码两栖生理素-1 蛋白中间部分（第 250-588 位氨基酸）的部分核苷酸序列。所用的正向和反向引物的序列分别为 5'-AACTGTCCACCATGAGTGATTCGGGTCCTCTCCGC-3' 和 5'-GGATCCCTACTGCTCCGTAGCCAGCTCCGG-3'。进行 PCR 扩增以及使用 pcDNA3（Invitrogen）以实施例 VII 中描述的相同方法对扩增产物进行亚克隆。最终载体的遗传图谱示于图 11 中。

实施例 X：在幼龄细胞中使用显性负两栖生理素-1 基因抑制胞吞功能

因此，老龄细胞对生长因子反应性的降低是由于 Erk-1/2 磷酸化的减少，即 Erk-1/2 活化的减少。

实施例 XII：通过蛋白质印迹分析小窝蛋白的表达

对人成纤维细胞或 IMR-90 细胞的幼龄细胞（PDL30 以下）、中龄细胞（PDL35-45）和老龄细胞（PDL60 以上）中小窝蛋白的表达进行分析，采用实施例 V 中描述的方法进行蛋白质印迹。抗小窝蛋白-1 单克隆抗体、抗小窝蛋白-2 单克隆抗体和抗小窝蛋白-3 单克隆抗体购自 Transduction Laboratories。如图 14 所示，在人成纤维细胞和 IMR-90 细胞中，随着细胞衰老，小窝蛋白-1、小窝蛋白-2 和小窝蛋白-3 的表达都增加了。

实施例 XIII：通过免疫沉淀分析 EGFR 与小窝蛋白-1 的相互作用

幼龄（PDL30 以下）或老龄（PDL60 以上）成纤维细胞在 IP 裂解缓冲液（10mM 磷酸缓冲液、pH7.4，150mM NaCl，1% NP-40，2mM EDTA，1mM 苯甲基磺酰氟，2μg/ml 抑肽酶，2μg/ml 亮抑酶肽，50mM NaF 和 0.2mM Na_3Vo_4）中裂解并经短暂超声破碎。裂解液于 9000rpm 离心 5 分钟，将上清液与正常的小鼠血清、抗 EGFR 抗体或抗小窝蛋白-1 抗体共同温育。免疫复合物用蛋白 A-琼脂糖珠（Amersham Pharmacia Biotech）沉淀，SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，然后用实施例 V 中描述的蛋白质印迹方法进行分析（参见图 15）。

图 15 的结果表明，老龄成纤维细胞的 EGFR 免疫复合物含有小窝蛋白-1，而幼龄成纤维细胞则未显示出可比较量的小窝蛋白-1 以及与 EGFR 的相互作用。

据此推断，随着细胞的衰老，小窝蛋白-1 的表达增加，从而有更多的小窝蛋白-1 与 EGFR 相互作用，进而抑制了 EGFR 激活 Erk-1/2 激酶。

使用实施例 IX 中构建的载体，对幼龄成纤维细胞（PDL 16）进行了转化，方法如下：将 2μg 实施例 IX 中构建的载体和 0.5μg pEGFP-N1 载体（Clontech）与 DMEM 和 8μl 的 Plus 试剂混合，混合液于室温放置 15 分钟。然后与脂转染胺试剂（Gibco-BRL）和 DMEM 充分混匀，于室温再放置 15 分钟。接着再加入 2ml DMEM，最终的混合物加入幼龄成纤维细胞中，37℃ 温育 3 小时。过 3 小时后，加入 2.5 ml 含有 20%FBS 的 DMEM，继续温育 40 小时。温育后的细胞用 25μg/ml 若丹明结合的运铁蛋白处理 10 分钟，使用聚焦显微镜（Biorad，#MRC1024）观察图象，由此阐述运铁蛋白在转化后的细胞（发出 EGFP 衍生的绿色荧光）或非转化的细胞中的内化（参见图 12）。如图 12 所示，用携带显性负两栖生理素-1 基因的载体和 pEGFP-N1 载体共转化的细胞（左组）没有显示出若丹明结合的运铁蛋白的红色荧光，这表明若丹明结合的运铁蛋白的内化没有发生，但是非转化的细胞（右组）显示出了红色荧光。

这些结果证明两栖生理素-1 的功能不全能够抑制受体介导的胞吞作用，并最终诱导细胞衰老。

实施例 XI：通过蛋白质印迹分析 Erk-1/2 的激活

人成纤维细胞或 IMR-90 细胞的幼龄细胞（PDL30 以下）、中龄细胞（PDL35-45）和老龄细胞（PDL60 以上）分别用 100 ng/mlEGF（Gibco-BRL，人源重组产品）进行刺激。刺激后，采用实施例 V 中描述的方法进行蛋白质印迹。抗磷酸-Erk-1/2 单克隆抗体、抗 Erk-1/2 多克隆抗体和抗 EGFR 多克隆抗体购自 Santa Cruz 生物技术公司。从图 13a 中可以发现，在幼龄和中龄细胞中，Erk-1/2 激酶在 5 分钟内就被磷酸化了（激活），产生的激活作用在 EGF 刺激后持续了 15 分钟。然而，在老龄细胞中，直到过了 15 分钟仍未能检测到 Erk-1/2 激酶的磷酸化。尽管 EGF 对 Erk-1/2 激酶有下调作用，但在蛋白质印迹中 Erk 激酶和 EGFR 的表达水平并未由于群体倍增的增加而改变（参见图 13b）。

实施例 XIV：小窝蛋白-1 的电子显微镜分析

离心（1000rpm）收集亚汇合的幼龄（PDL 20）和老龄（PDL 65）成纤维细胞，并用 3%戊二醛/pH7.4 磷酸盐缓冲液固定。在用 0.2M pH7.4 的二甲胂酸钠缓冲液洗涤后，细胞沉淀再用 1%四氧化锇的二甲胂酸钠缓冲液处理 1 小时。然后细胞使用环氧丙烷在分级的乙醇步骤中脱水，并包埋于 Embed812（Electron Microscope Sciences）中。使用切片机（Leichert-JUNG）将包埋好的细胞切成 200nm 的大小，用亚甲蓝和苯胺蓝 II 将切片染色，然后用光学显微镜观察以选择适用于电子显微镜观察的区域。随后，用切片机（Leichert-JUNG）将选定区域超薄切成 60nm 的大小，用乙酸双氧铀和柠檬酸铅染色。切片用透射电子显微镜（H-600，Hitachi）进行观察。图 16 表明，与幼龄细胞相比，老龄成纤维细胞含有多得多的类似小窝的结构。

实施例 XV：携带小窝蛋白-1 cDNA 的质粒的构建

使用 TRIzol（Gibco-BRL，#15596-026）从人老龄成纤维细胞中分离出总 RNA，再使用分离到的 RNA 通过 RT-PCR 的方法获得小窝蛋白-1cDNA。使用的引物是：正向引物 5'-atccaagcttccaccatgtctgggggcaaatacgt-3' 和反向引物 5'-gcaggatccctatatttctttctgcaagttgat-3'。使用的反转录酶和 Taq 聚合酶分别是 Promega 公司的 AMT 反转录酶和 TaKaRa 公司的 Ex Taq。温度设置为 60℃、30 秒（退火），72℃、50 秒（延伸）以及 92℃、30 秒（变性）。扩增得到的 cDNA 通过 DNA 测序进行确证，测序方法参照链终止法（Sanger, F. 等， Proc. Natl. Acad. Sci., 74:5463(1977)）。小窝蛋白-1 cDNA 的核苷酸序列见 SEQ ID NO:3。利用 HindIII 和 BamHI 限制性位点将扩增的 cDNA 亚克隆在 pcDNA3（Invitrogen）中。最终构建的载体的遗传图谱示于图 17 中。

实施例 XVI：使用小窝蛋白-1 cDNA 转化人成纤维细胞

使用实施例 XV 中构建的载体转化幼龄人成纤维细胞（PDL 25）。

将细胞铺于平皿中温育 18 小时达到 70-80%汇合。2μg 实施例 XV 中构建的载体与 8μl Plus 试剂混合，所得混合物再与 12μl 脂转染胺试剂（Gibco-BRL）和 238μl DMEM 混合，接着将混合物室温放置 15 分钟。另加入 2ml DEME 后，将最终混合物加入幼龄成纤维细胞中，于 37℃温育 3 小时。过 3 小时后，加入 2.5ml 含 20% FBS 的 DMEM，继续温育 24 小时。30 小时后，用 100μg/ml EGF 刺激转染的细胞。最后按照实施例 V 中描述的方法进行蛋白质印迹以便能够检测 Erk-1/2 的活化。在图 18 中，组 A 的 1 道代表用 pcDNA3 转化的样品，2 道代表用携带小窝蛋白-1 cDNA 的 pcDNA3 转化的样品。图 18 的结果证实，用携带小窝蛋白-1 cDNA 的 pcDNA3 转化的细胞表达了小窝蛋白-1 蛋白。在图 18 中，组 B 的 1-3 道分别代表了用 pcDNA3 转化并随后用 EGF 刺激 0、5 和 20 分钟的样品，以及组 B 的 4-6 道分别代表了用携带小窝蛋白-1 cDNA 的 pcDNA3 转化并随后用 EGF 刺激 0、5 和 20 分钟的样品。

如图 18 所示，在细胞过量表达小窝蛋白-1 蛋白时，Erk-1/2 激酶的表达没有改变，与对照的转化细胞相比，Erk-1/2 的磷酸化反而被显著地抑制了。

这些数据证实当把小窝蛋白-1 DNA 导入细胞中时 Erk-1/2 激酶的活化受到阻断，从而对刺激的反应也降低，由此导致细胞衰老。结果表明 Erk-1/2 激酶活化的降低是由于小窝蛋白-1 表达水平降低造成的。

实施例 XVII：小窝蛋白-1 反义寡核苷酸的转染

XVII-1：小窝蛋白-1 反义寡核苷酸的合成

为了制备反义寡核苷酸以抑制小窝蛋白-1 的表达，在小窝蛋白-1 的 mRNA 上选择了一个适当区域与反义寡核苷酸相互作用。因此，设计并合成了能够结合在小窝蛋白-1 mRNA 的翻译起始区的反义寡核苷酸，以阻断翻译的起始。合成的寡核苷酸在 5'端区结合了荧光素（Genotech），并用硫代磷酸修饰以增加其稳定性。例如，合成的反

义寡核苷酸具有的核苷酸序列为 5'-tttgcccccaga-3'。同时与上述区域结合的有义寡核苷酸也被合成，序列为 5'-atgtctgggggc-3'。

XVII-2：小窝蛋白-1 反义寡核苷酸的转染

人老龄成纤维细胞（PDL 64）置于 24 孔板或平皿中，加入不含 FBS 的 DMEM，并在培养箱（37℃、5% CO_2）中温育 12 小时。其后，将 1-5μl 100μM 的合成反义寡核苷酸和 Plus 试剂（Gibco-BRL）与 50μl DMEM 混合，并随后于室温反应 15 分钟，所得混合物与 500μl 含有 12μl 脂转染胺试剂（Gibco-BRL）和 DMEM 的混合液充分混匀，再于室温放置 15 分钟以形成脂质体复合物。温育后的细胞用 DMEM（无血清）洗涤两次，并用 1ml 脂质体复合物处理，接着 37℃ 温育 3 小时。向转染后的细胞中加入 1-5ml 含 10% FBS 的 DMEM，并继续温育 24 小时，然后用含 10% FBS 的 DMEM 替换培养基。在温育一定时间后，按照下述方法进行免疫染色和蛋白质印迹。

XVII-3：免疫染色

经反义寡核苷酸处理过的细胞用 0.5ml 4%低聚甲醛在室温固定 20 分钟，然后用 0.5ml 含 0.5% Triton X-100 的磷酸缓冲液处理 10 分钟以增加通透性，再用含 2%牛血清白蛋白的磷酸缓冲液封闭。接着将细胞与抗小窝蛋白-1 抗体（Transduction Laboratory）在 4℃ 温育过夜，然后与若丹明结合的次级抗体（Santa Cruz）室温下温育 1 小时。为了能够看见细胞核，也加入了 DAPI（分子探针）。使用聚焦显微镜（Biorad，#MRC1024）观察。如图 19 所示，在用反义寡核苷酸处理一段时间以后，细胞中小窝蛋白-1 的表达急剧降低，而在用有义寡核苷酸处理的细胞中小窝蛋白-1 的表达没有变化。有趣的是，用反义寡核苷酸处理的老龄细胞在形态上发生了改变，从较大、伸展的形态变为较小的纺锤形。与之相反，用有义寡核苷酸处理的老龄细胞的形态没有发生如此的变化。

XVII-4：蛋白质印迹

以实施例 XII 相同的方法对用寡核苷酸处理过的细胞进行蛋白质印迹。用反义寡核苷酸处理过的细胞，在对应于小窝蛋白-1 的位置给出了一条较弱的带，这表明在用反义寡核苷酸处理过的细胞中，小窝蛋白-1 的表达降低了。

基于免疫染色和蛋白质印迹的结果，可以说明小窝蛋白-1 直接参与了细胞衰老过程，抑制小窝蛋白-1 的表达不仅可以防止细胞衰老，而且可以将老龄细胞转化为幼龄细胞。

实施例 XVIII：对小窝蛋白-1 反义寡核苷酸转染后的 Erk-1/2 活化进行分析

按实施例 XVII 中描述的方法用反义寡核苷酸处理老龄和幼龄成纤维细胞。按照实施例 XI 中描述的方法进行 EGF 刺激和蛋白质印迹。本实施例的结果见图 20。如图 20 所示，幼龄细胞中的 Erk-1/2 激酶被强烈磷酸化（激活）。但是与幼龄细胞相比，未处理的老龄细胞和用有义寡核苷酸处理的老龄细胞则表现出较高的 Erk-1/2 基础活性，并且用 EGF 刺激后，细胞的 Ekr-1/2 活性没有变化。有趣的是，在用反义寡核苷酸处理的老龄细胞中，EGF 刺激的 Erk-1/2 活化作用极大地增强了，正如在幼龄细胞中发生的情况一样。

这些观察证明，由于用反义寡核苷酸处理抑制小窝蛋白-1 的表达，能够使老龄细胞恢复由 Erk 介导的信号级联，而这样的信号级联通常是存在于幼龄细胞中的。

实施例 XIX：观察小窝蛋白-1 反义寡核苷酸转染后对 P-Erk-1/2 向细胞核内转运的影响

为了证实在实施例 XVIII 中激活的 Erk-1/2 激酶被转运到细胞核内并随后调节其它基因的表达，使用了如下的免疫染色的方法：参照实施例 XIII 用反义寡核苷酸和 EGF 处理幼龄和老龄成纤维细胞。然后将处理过的细胞与抗 P-Erk（磷酸化 ErK）抗体（New England

Biotech）在 4℃ 温育过夜，然后与 FITC 结合的次级抗体(Santa Cruz)室温下温育 1 小时。为了能够看见细胞核，加入了 DAPI（分子探针）。使用聚焦显微镜（Biorad，#MRC1024）观察 P-Erk-1/2 定位的图象，见图 21 和图 22。在图 21 和 22 中，箭头标明了 P-Erk-1/2 激酶向细胞核中的转运。

如图 21 所示，在幼龄细胞中，处理后 5 分钟时，在细胞质中可观察到很强的 P-Erk-1/2，处理后 30 分钟时，可观察到 P-Erk-1/2 被转运到细胞核内以及处理后 60 分钟时，仅在细胞质中观察到较弱的 P-Erk-1/2。这些结果表明，在处理后 5 分钟内，Erk-1/2 即被激活（磷酸化），产生的 P-Erk-1/2 在 30 分钟时被转运到细胞核内以调节了几个基因的转录，以及在 60 分钟时最终失活。与幼龄细胞相反，在老龄细胞中不论是否用 EGF 处理，在细胞质中都观察到了很强的 P-Erk-1/2，在蛋白质印迹的结果中也得到了同样的发现。有趣的是，老龄细胞中没有观察到 P-Erk-1/2 向细胞核内的转运。

此外，如图 22 所示，用有义寡核苷酸处理的老龄细胞的细胞核内未观察到 P-Erk-1/2，用反义寡核苷酸处理的老龄细胞中也一样。

这些结果证明，用反义寡核苷酸抑制小窝蛋白-1 的表达，导致了 Erk 介导的信号级联的恢复。此外，这些结果也表明小窝蛋白-1 还参与了向细胞核内转运的恢复，这样的转运在老龄细胞中通常是被阻断的。

实施例 XX：小窝蛋白-1 基因 CpG 岛的甲基化

众所周知，当衰老后，随着位于启动子中的 CpG 岛的甲基化水平的降低，p16/Ink4a 的表达增加（Jarrard DF.，Cancer Res.，15；59(12):2957-2964（1999））。此外，已发现在癌细胞中小窝蛋白-1 也有相似的甲基化模式（Cui J.，Prostate，15；46（3）：249-256（2001））。因此，本发明人研究了小窝蛋白-1 表达的降低是否是由这样的甲基化

引起的。

用 1μM 脱甲基化试剂 5-氮杂-脱氧胞苷（Sigma）的 DMSO 处理幼龄成纤维细胞（PDL 20），并在随后的 2-3 周内随着定期替换培养基同时用该试剂处理。采用实施例 III 中描述的 SA β-gal 活性染色的方法证实细胞衰老的诱导。为研究相关蛋白的表达，收集处理不同天的处理细胞，按照以前描述的方法进行蛋白质印迹。蛋白质印迹中所用的抗 p53 抗体、抗 p16 抗体、抗小窝蛋白-1 抗体和抗肌动蛋白抗体购自 Santa Cruz 生物技术公司。

图 23a 显示了 SA β-gal 活性染色的结果，处理 2 周的幼龄细胞表现出了类似衰老细胞的现象。图 23b 显示了蛋白质印迹的结果，随着脱甲基化过程，p16 和小窝蛋白-1 的表达增加，但 p53 的表达没有变化。有趣的是，p16 水平的增加出现于细胞衰老的早期阶段，而小窝蛋白-1 水平的增加比 p16 还早出现。这些结果说明，在衰老细胞中小窝蛋白-1 水平的增加，既不是由细胞衰老也不是由 p16 水平的增加所直接引起的，而是由小窝蛋白-1 基因启动子中 CpG 岛的脱甲基化引起的。

结果显示，细胞衰老能够由小窝蛋白-1 基因启动子、特别是 CpG 岛的甲基化水平所调节。

在描述了本发明的优选实施方案后，应理解的是，对于本领域那些专业技术的人来说很显然本发明的变体和修饰落入了本发明的实质范围内，本发明的范围将由附加的权利要求及其等同物所确定。

<110> 代谢工程实验室有限公司（Metabolic Engineering Laboratories Co.,Ltd.）

<120> 参与细胞衰老的核酸序列和蛋白质
（Nucleic Acid Sequences and Proteins Involved in Cellular Senescence）

<130> SCT030540-47

<150> KR2000-53341
<151> 2000-09-08

<150> KR2000-53342
<151> 2000-09-08

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 2377
<212> DNA
<213> 智人（Homo sapiens）

<220>
<221> CDS
<222> (111)..(2195)
<223> 两栖生理素-1 cDNA（amphiphysin-1 cDNA）

<400> 1
cggctctcag ctgcactcct gtacatccac ctgtcttcag gagagcactg tttgtgtgtg 60

cccagccccg ctgcgcgctc tgctcttcgc agctccccgg acccgcagcc atg gcc gac 119
Met Ala Asp
1

atc aag acg ggc atc ttc gcc aag aac atc cag aag cga ctc aac cgc 167
Ile Lys Thr Gly Ile Phe Ala Lys Asn Ile Gln Lys Arg Leu Asn Arg
5 10 15

gcg cag gaa aag gtc ctc caa aag ctg ggg aaa gct gat gag aca aaa 215
Ala Gln Glu Lys Val Leu Gln Lys Leu Gly Lys Ala Asp Glu Thr Lys

20 25 30 35

gac gaa cag ttc gaa gaa tat gtc cag aac ttc aaa cgg caa gaa gca 263
Asp Glu Gln Phe Glu Glu Tyr Val Gln Asn Phe Lys Arg Gln Glu Ala
40 45 50

gag ggt acc aga ctt cag cga gaa ctc cga gga tat tta gca gca atc 311
Glu Gly Thr Arg Leu Gln Arg Glu Leu Arg Gly Tyr Leu Ala Ala Ile
55 60 65

aaa ggc atg cag gag gcc tcc atg aag ctc aca gag tcg ctg cat gaa 359
Lys Gly Met Gln Glu Ala Ser Met Lys Leu Thr Glu Ser Leu His Glu
70 75 80

gtc tat gag cct gac tgg tat ggg cgg gaa gat gtg aaa atg gtt ggt 407
Val Tyr Glu Pro Asp Trp Tyr Gly Arg Glu Asp Val Lys Met Val Gly
85 90 95

gag aaa tgt gat gtg ctg tgg gaa gac ttc cat caa aaa ctc gtg gat 455
Glu Lys Cys Asp Val Leu Trp Glu Asp Phe His Gln Lys Leu Val Asp
100 105 110 115

ggg tcc ttg cta aca ctg gat acc tac ctg ggg caa ttt cct gac ata 503
Gly Ser Leu Leu Thr Leu Asp Thr Tyr Leu Gly Gln Phe Pro Asp Ile
120 125 130

aag aat cgc atc gcc aag cgc agc agg aag cta gtg gac tat gac agt 551
Lys Asn Arg Ile Ala Lys Arg Ser Arg Lys Leu Val Asp Tyr Asp Ser
135 140 145

gcc cgc cac cat ctg gaa gct ctg cag agc tcc aag agg aag gat gag 599
Ala Arg His His Leu Glu Ala Leu Gln Ser Ser Lys Arg Lys Asp Glu
150 155 160

agt cga atc tct aag gca gaa gaa gaa ttt cag aaa gca cag aaa gtg 647
Ser Arg Ile Ser Lys Ala Glu Glu Glu Phe Gln Lys Ala Gln Lys Val
165 170 175

ttt gaa gag ttt aac gtt gac tta caa gaa gag tta cca tca tta tgg 695
Phe Glu Glu Phe Asn Val Asp Leu Gln Glu Glu Leu Pro Ser Leu Trp
180 185 190 195

tca aga cga gtt gga ttt tat gtt aat act ttc aaa aac gtc tcc agc 743
Ser Arg Arg Val Gly Phe Tyr Val Asn Thr Phe Lys Asn Val Ser Ser

200 205 210

ctt gaa gcc aag ttt cat aag gaa att gcg gtg ctt tgc cac aaa ctg 791
Leu Glu Ala Lys Phe His Lys Glu Ile Ala Val Leu Cys His Lys Leu
215 220 225

tat gaa gtg atg aca aaa ctg ggt gac cag cac gcc gac aag gcc ttc 839
Tyr Glu Val Met Thr Lys Leu Gly Asp Gln His Ala Asp Lys Ala Phe
230 235 240

acc atc caa gga gcg ccc agt gat tcg ggt cct ctc cgc att gca aag 887
Thr Ile Gln Gly Ala Pro Ser Asp Ser Gly Pro Leu Arg Ile Ala Lys
245 250 255

aca cca tca ccg cct gag gag cct tca ccc ctc ccg agc ccg aca gca 935
Thr Pro Ser Pro Pro Glu Glu Pro Ser Pro Leu Pro Ser Pro Thr Ala
260 265 270 275

agt cca aat cat aca tta gca cct gcg tct ccc gca cca gca cgg cct 983
Ser Pro Asn His Thr Leu Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ala Arg Pro
280 285 290

cgg tca cct tca cag aca agg aaa ggg cct cct gtc cca cct cta cct 1031
Arg Ser Pro Ser Gln Thr Arg Lys Gly Pro Pro Val Pro Pro Leu Pro
295 300 305

aaa gtc acc ccg aca aag gaa ctg cag cag gag aac atc atc agt ttc 1079
Lys Val Thr Pro Thr Lys Glu Leu Gln Gln Glu Asn Ile Ile Ser Phe
310 315 320

ttt gag gac aac ttt gtt cca gaa atc agt gtg aca aca cct tcc cag 1127
Phe Glu Asp Asn Phe Val Pro Glu Ile Ser Val Thr Thr Pro Ser Gln
325 330 335

aat gaa gtc cct gag gtg aag aaa gag gag act ttg ctg gat ctg gac 1175
Asn Glu Val Pro Glu Val Lys Lys Glu Glu Thr Leu Leu Asp Leu Asp
340 345 350 355

ttt gat cct ttc aag ccc gag gtg aca cct gca ggt tct gct gga gtg 1223
Phe Asp Pro Phe Lys Pro Glu Val Thr Pro Ala Gly Ser Ala Gly Val
360 365 370

acc cac tca ccc atg tct cag aca ttg ccc tgg gac cta tgg acg aca 1271
Thr His Ser Pro Met Ser Gln Thr Leu Pro Trp Asp Leu Trp Thr Thr

375 380 385

agc act gat ttg gta cag ccg gct tct ggt ggt tca ttt aat gga ttc 1319
Ser Thr Asp Leu Val Gln Pro Ala Ser Gly Gly Ser Phe Asn Gly Phe
390 395 400

aca cag ccc cag gat act tca tta ttc aca atg cag aca gac cag agt 1367
Thr Gln Pro Gln Asp Thr Ser Leu Phe Thr Met Gln Thr Asp Gln Ser
405 410 415

atg atc tgc aac ttg gct gaa tct gaa cag gct cca ccc aca gag cca 1415
Met Ile Cys Asn Leu Ala Glu Ser Glu Gln Ala Pro Pro Thr Glu Pro
420 425 430 435

aaa gca gag gag cct ctg gct gct gtc aca cct gcc gtt ggt ctg gac 1463
Lys Ala Glu Glu Pro Leu Ala Ala Val Thr Pro Ala Val Gly Leu Asp
440 445 450

ctt gga atg gac act cgg gct gag gag cca gtg gag gag gca gtg atc 1511
Leu Gly Met Asp Thr Arg Ala Glu Glu Pro Val Glu Glu Ala Val Ile
455 460 465

ata cct gga gct gat gct gat gca gct gtt gga acc ttg gtg tca gca 1559
Ile Pro Gly Ala Asp Ala Asp Ala Ala Val Gly Thr Leu Val Ser Ala
470 475 480

gct gag ggg gcc cca gga gag gaa gca gag gcg gag aag gcc act gtc 1607
Ala Glu Gly Ala Pro Gly Glu Glu Ala Glu Ala Glu Lys Ala Thr Val
485 490 495

cct gcc ggg gaa gga gta agt tta gag gag gcc aaa att gga act gaa 1655
Pro Ala Gly Glu Gly Val Ser Leu Glu Glu Ala Lys Ile Gly Thr Glu
500 505 510 515

acc act gag ggt gca gag agt gcc caa cct gaa gca gag gag ctc gaa 1703
Thr Thr Glu Gly Ala Glu Ser Ala Gln Pro Glu Ala Glu Glu Leu Glu
520 525 530

gca aca gtg cct cag gag aag gtc att cct tcg gtg gtc ata gag cct 1751
Ala Thr Val Pro Gln Glu Lys Val Ile Pro Ser Val Val Ile Glu Pro
535 540 545

gcc tcc aac cat gaa gag gaa gga gaa aac gaa ata act ata ggt gca 1799
Ala Ser Asn His Glu Glu Glu Gly Glu Asn Glu Ile Thr Ile Gly Ala

```
        550                 555                 560

gag ccc aag gag acc acc gag gac gcg gct cct ccg ggc ccc acc agc        1847
Glu Pro Lys Glu Thr Thr Glu Asp Ala Ala Pro Pro Gly Pro Thr Ser
    565                 570                 575

gag aca ccg gag ctg gct acg gag cag aag cct atc cag gac cct cag        1895

Glu Thr Pro Glu Leu Ala Thr Glu Gln Lys Pro Ile Gln Asp Pro Gln
580                 585                 590                 595

ccc acg cct tct gca cca gcc atg ggg gct gct gac cag cta gca tct        1943
Pro Thr Pro Ser Ala Pro Ala Met Gly Ala Ala Asp Gln Leu Ala Ser
                600                 605                 610

gca agg gag gcc tct cag gaa ttg cct cct ggc ttt ctc tac aag gtg        1991
Ala Arg Glu Ala Ser Gln Glu Leu Pro Pro Gly Phe Leu Tyr Lys Val
            615                 620                 625

gaa aca ctg cat gat ttt gag gca gca aat tct gat gaa ctt acc tta        2039
Glu Thr Leu His Asp Phe Glu Ala Ala Asn Ser Asp Glu Leu Thr Leu
        630                 635                 640

caa agg ggt gat gtg gtg ctg gtg gtc ccc tca gat tca gaa gct gat        2087
Gln Arg Gly Asp Val Val Leu Val Val Pro Ser Asp Ser Glu Ala Asp
    645                 650                 655

cag gat gca ggc tgg ctg gtg gga gtg aag gaa tca gac tgg ctt cag        2135
Gln Asp Ala Gly Trp Leu Val Gly Val Lys Glu Ser Asp Trp Leu Gln
660                 665                 670                 675

tac aga gac ctt gcc acc tac aaa ggc ctc ttt cca gag aac ttc acc        2183
Tyr Arg Asp Leu Ala Thr Tyr Lys Gly Leu Phe Pro Glu Asn Phe Thr
                680                 685                 690

cga cgc tta gat taggg caacaagtac tgcaagaagg agctcagtta cggggttttt      2240
Arg Arg Leu Asp
            695

aaaccttcat gaaaacctga agagttcact tttgttatta tgctcttaat gatttacaga      2300

ctgatgccag acaaaccttg ggaagatgta tcaatggagc atgtgtgcaa aaaaatgtaa      2360

gaggaaaaaa aaaaccg                                                    2377
```

<210> 2
<211> 695
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

```
Met Ala Asp Ile Lys Thr Gly Ile Phe Ala Lys Asn Ile Gln Lys Arg
  1               5                  10                  15

Leu Asn Arg Ala Gln Glu Lys Val Leu Gln Lys Leu Gly Lys Ala Asp
             20                  25                  30

Glu Thr Lys Asp Glu Gln Phe Glu Glu Tyr Val Gln Asn Phe Lys Arg
         35                  40                  45

Gln Glu Ala Glu Gly Thr Arg Leu Gln Arg Glu Leu Arg Gly Tyr Leu
     50                  55                  60

Ala Ala Ile Lys Gly Met Gln Glu Ala Ser Met Lys Leu Thr Glu Ser
 65                  70                  75                  80

Leu His Glu Val Tyr Glu Pro Asp Trp Tyr Gly Arg Glu Asp Val Lys
                 85                  90                  95

Met Val Gly Glu Lys Cys Asp Val Leu Trp Glu Asp Phe His Gln Lys
            100                 105                 110

Leu Val Asp Gly Ser Leu Leu Thr Leu Asp Thr Tyr Leu Gly Gln Phe
        115                 120                 125

Pro Asp Ile Lys Asn Arg Ile Ala Lys Arg Ser Arg Lys Leu Val Asp
    130                 135                 140

Tyr Asp Ser Ala Arg His His Leu Glu Ala Leu Gln Ser Ser Lys Arg
145                 150                 155                 160

Lys Asp Glu Ser Arg Ile Ser Lys Ala Glu Glu Glu Phe Gln Lys Ala
                165                 170                 175

Gln Lys Val Phe Glu Glu Phe Asn Val Asp Leu Gln Glu Glu Leu Pro
            180                 185                 190
```

Ser Leu Trp Ser Arg Arg Val Gly Phe Tyr Val Asn Thr Phe Lys Asn
195 200 205

Val Ser Ser Leu Glu Ala Lys Phe His Lys Glu Ile Ala Val Leu Cys
210 215 220

His Lys Leu Tyr Glu Val Met Thr Lys Leu Gly Asp Gln His Ala Asp
225 230 235 240

Lys Ala Phe Thr Ile Gln Gly Ala Pro Ser Asp Ser Gly Pro Leu Arg
245 250 255

Ile Ala Lys Thr Pro Ser Pro Pro Glu Glu Pro Ser Pro Leu Pro Ser
260 265 270

Pro Thr Ala Ser Pro Asn His Thr Leu Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro
275 280 285

Ala Arg Pro Arg Ser Pro Ser Gln Thr Arg Lys Gly Pro Pro Val Pro
290 295 300

Pro Leu Pro Lys Val Thr Pro Thr Lys Glu Leu Gln Gln Glu Asn Ile
305 310 315 320

Ile Ser Phe Phe Glu Asp Asn Phe Val Pro Glu Ile Ser Val Thr Thr
325 330 335

Pro Ser Gln Asn Glu Val Pro Glu Val Lys Lys Glu Glu Thr Leu Leu
340 345 350

Asp Leu Asp Phe Asp Pro Phe Lys Pro Glu Val Thr Pro Ala Gly Ser
355 360 365

Ala Gly Val Thr His Ser Pro Met Ser Gln Thr Leu Pro Trp Asp Leu
370 375 380

Trp Thr Thr Ser Thr Asp Leu Val Gln Pro Ala Ser Gly Gly Ser Phe
385 390 395 400

Asn Gly Phe Thr Gln Pro Gln Asp Thr Ser Leu Phe Thr Met Gln Thr
405 410 415

Asp Gln Ser Met Ile Cys Asn Leu Ala Glu Ser Glu Gln Ala Pro Pro
420 425 430

```
Thr Glu Pro Lys Ala Glu Glu Pro Leu Ala Ala Val Thr Pro Ala Val
        435                 440                 445

Gly Leu Asp Leu Gly Met Asp Thr Arg Ala Glu Glu Pro Val Glu Glu
    450                 455                 460

Ala Val Ile Ile Pro Gly Ala Asp Ala Asp Ala Ala Val Gly Thr Leu
465                 470                 475                 480

Val Ser Ala Ala Glu Gly Ala Pro Gly Glu Glu Ala Glu Ala Glu Lys
                485                 490                 495

Ala Thr Val Pro Ala Gly Glu Gly Val Ser Leu Glu Glu Ala Lys Ile
            500                 505                 510

Gly Thr Glu Thr Thr Glu Gly Ala Glu Ser Ala Gln Pro Glu Ala Glu
        515                 520                 525

Glu Leu Glu Ala Thr Val Pro Gln Glu Lys Val Ile Pro Ser Val Val
    530                 535                 540

Ile Glu Pro Ala Ser Asn His Glu Glu Glu Gly Glu Asn Glu Ile Thr
545                 550                 555                 560

Ile Gly Ala Glu Pro Lys Glu Thr Thr Glu Asp Ala Ala Pro Pro Gly
                565                 570                 575

Pro Thr Ser Glu Thr Pro Glu Leu Ala Thr Glu Gln Lys Pro Ile Gln
            580                 585                 590

Asp Pro Gln Pro Thr Pro Ser Ala Pro Ala Met Gly Ala Ala Asp Gln
        595                 600                 605

Leu Ala Ser Ala Arg Glu Ala Ser Gln Glu Leu Pro Pro Gly Phe Leu
    610                 615                 620

Tyr Lys Val Glu Thr Leu His Asp Phe Glu Ala Ala Asn Ser Asp Glu
625                 630                 635                 640

Leu Thr Leu Gln Arg Gly Asp Val Val Leu Val Val Pro Ser Asp Ser
                645                 650                 655

Glu Ala Asp Gln Asp Ala Gly Trp Leu Val Gly Val Lys Glu Ser Asp
```

660 665 670

Trp Leu Gln Tyr Arg Asp Leu Ala Thr Tyr Lys Gly Leu Phe Pro Glu
675 680 685

Asn Phe Thr Arg Arg Leu Asp
690 695

<210> 3
<211> 829
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
<221> CDS
<222> (26)..(559)
<223> 小窝蛋白-1 cDNA (caveolin-1 cDNA)

<400> 3
agttttcatc cagccacggg ccagc atg tct ggg ggc aaa tac gta gac 49
Met Ser Gly Gly Lys Tyr Val Asp
1 5

tcg gag gga cat ctc tac acc gtt ccc atc cgg gaa cag ggc aac atc 97
Ser Glu Gly His Leu Tyr Thr Val Pro Ile Arg Glu Gln Gly Asn Ile
10 15 20

tac aag ccc aac aac aag gcc atg gca gac gag ctg agc gag aag caa 145
Tyr Lys Pro Asn Asn Lys Ala Met Ala Asp Glu Leu Ser Glu Lys Gln
25 30 35 40

gtg tac gac gcg cac acc aag gag atc gac ctg gtc aac cgc gac cct 193
Val Tyr Asp Ala His Thr Lys Glu Ile Asp Leu Val Asn Arg Asp Pro
45 50 55

aaa cac ctc aac gat gac gtg gtc aag att gac ttt gaa gat gtg att 241
Lys His Leu Asn Asp Asp Val Val Lys Ile Asp Phe Glu Asp Val Ile
60 65 70

gca gaa cca gaa ggg aca cac agt ttt cac ggc att tgg aag gcc agc 289
Ala Glu Pro Glu Gly Thr His Ser Phe His Gly Ile Trp Lys Ala Ser
75 80 85

ttc acc acc ttc act gtg acg aaa tac tgg ttt tac cgc ttg ctg tct 337
Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys Tyr Trp Phe Tyr Arg Leu Leu Ser
90 95 100

gcc ctc ttt ggc atc ccg atg gca ctc atc tgg ggc att tac ttc gcc 385
Ala Leu Phe Gly Ile Pro Met Ala Leu Ile Trp Gly Ile Tyr Phe Ala
105 110 115 120

att ctc tct ttc ctg cac atc tgg gca gtt gta cca tgc att aag agc 433
Ile Leu Ser Phe Leu His Ile Trp Ala Val Val Pro Cys Ile Lys Ser
125 130 135

ttc ctg att gag att cag tgc acc agc cgt gtc tat tcc atc tac gtc 481
Phe Leu Ile Glu Ile Gln Cys Thr Ser Arg Val Tyr Ser Ile Tyr Val
140 145 150

cac acc gtc tgt gac cca ctc ttt gaa gct gtt ggg aaa ata ttc agc 529
His Thr Val Cys Asp Pro Leu Phe Glu Ala Val Gly Lys Ile Phe Ser
155 160 165

aat gtc cgc atc aac ttg cag aaa gaa ata t aaatgacatt tcaaggatag 580
Asn Val Arg Ile Asn Leu Gln Lys Glu Ile
170 175

aagtatacct gatttttttt ccttttaatt ttcctggtgc caatttcaag ttccaagttg 640

ctaatacagc aacgaattta tgaattgaat tatcttggtt gaaaataaaa agatcacttt 700

ctcagtttc ataagtatta tgtctcttct gagctatttc atctattttt ggcagtctga 760

atttttaaaa cccatttata tttctttcct tacctttta tttgcatgtg gatcaaccat 820

cgctttatt 829

<210> 4
<211> 178
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4
Met Ser Gly Gly Lys Tyr Val Asp Ser Glu Gly His Leu Tyr Thr Val
1 5 10 15

Pro Ile Arg Glu Gln Gly Asn Ile Tyr Lys Pro Asn Asn Lys Ala Met
20 25 30

Ala Asp Glu Leu Ser Glu Lys Gln Val Tyr Asp Ala His Thr Lys Glu
35 40 45

Ile Asp Leu Val Asn Arg Asp Pro Lys His Leu Asn Asp Asp Val Val
50 55 60

Lys Ile Asp Phe Glu Asp Val Ile Ala Glu Pro Glu Gly Thr His Ser
65 70 75 80

Phe His Gly Ile Trp Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys
85 90 95

Tyr Trp Phe Tyr Arg Leu Leu Ser Ala Leu Phe Gly Ile Pro Met Ala
100 105 110

Leu Ile Trp Gly Ile Tyr Phe Ala Ile Leu Ser Phe Leu His Ile Trp
115 120 125

Ala Val Val Pro Cys Ile Lys Ser Phe Leu Ile Glu Ile Gln Cys Thr
130 135 140

Ser Arg Val Tyr Ser Ile Tyr Val His Thr Val Cys Asp Pro Leu Phe
145 150 155 160

Glu Ala Val Gly Lys Ile Phe Ser Asn Val Arg Ile Asn Leu Gln Lys
165 170 175

Glu Ile

图1

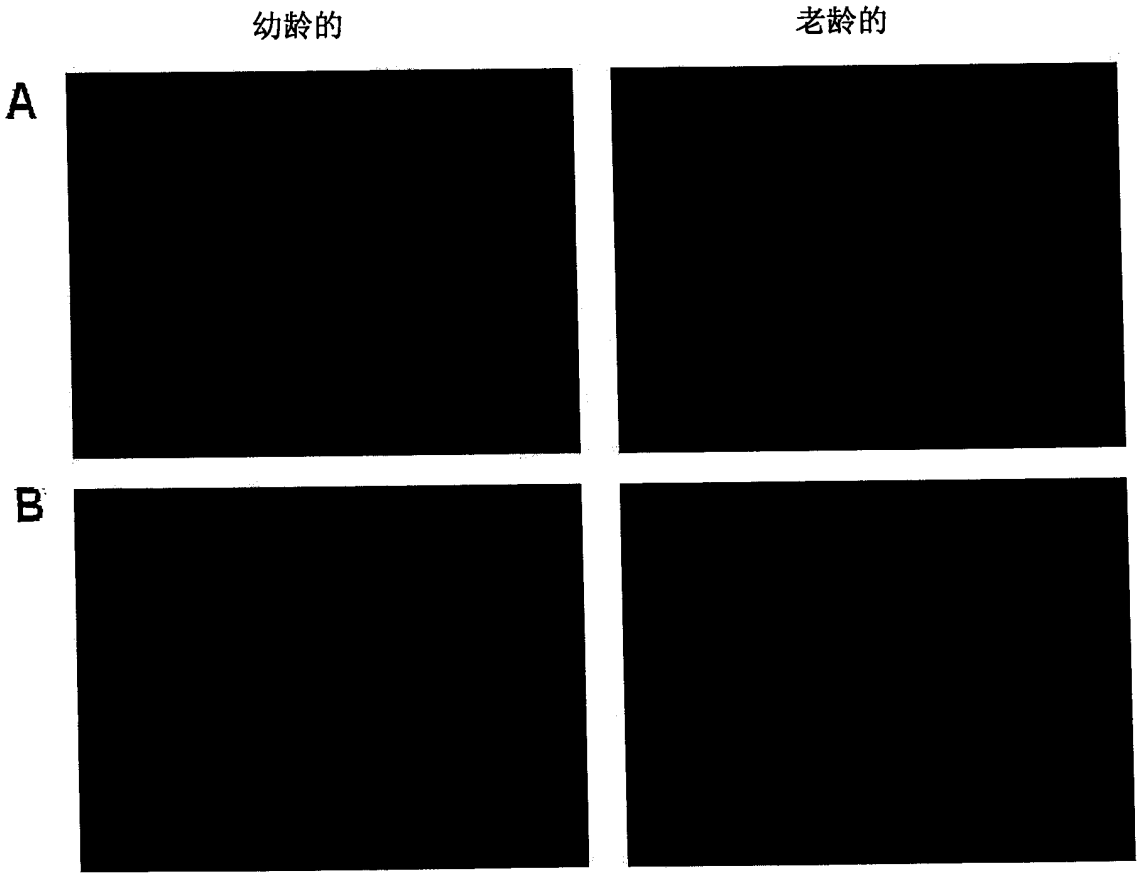

图2

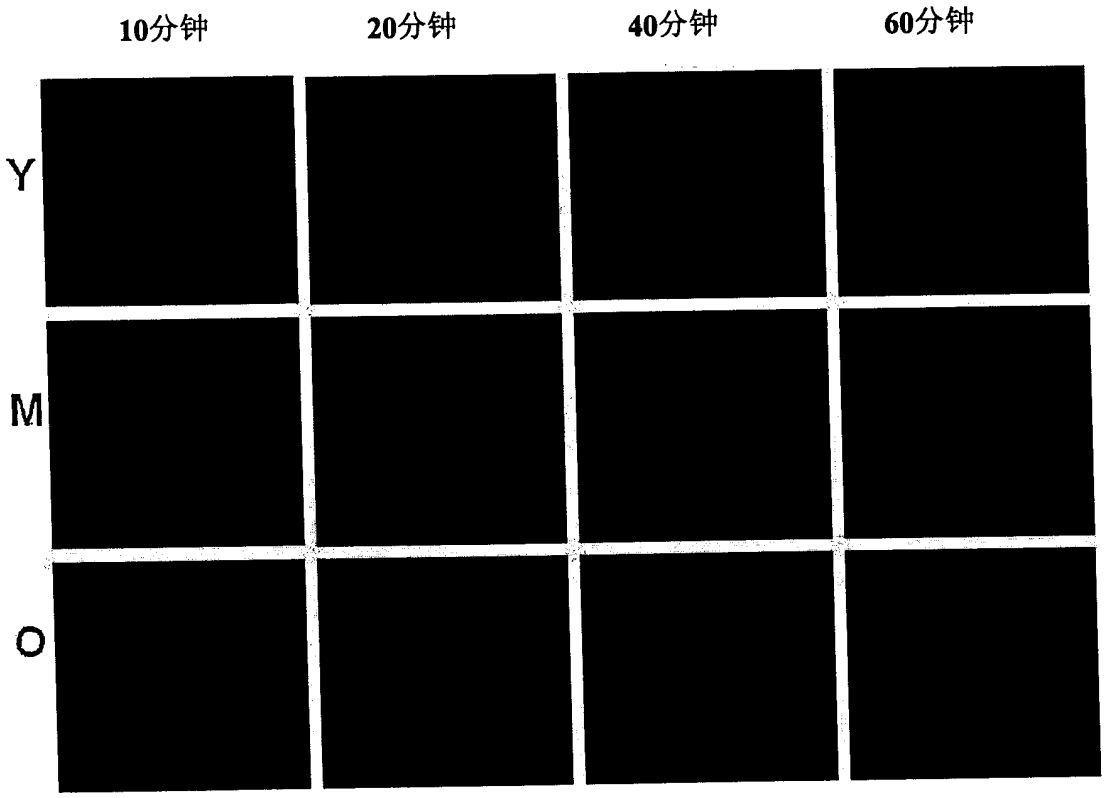

图3

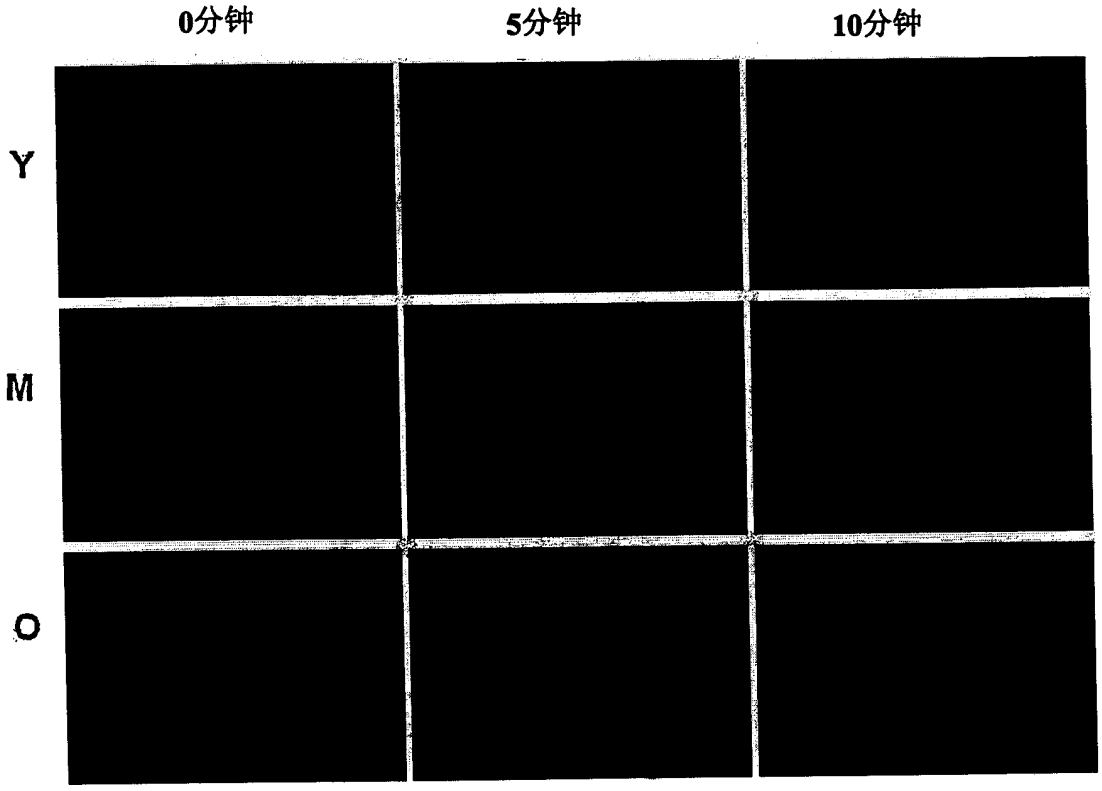

图4

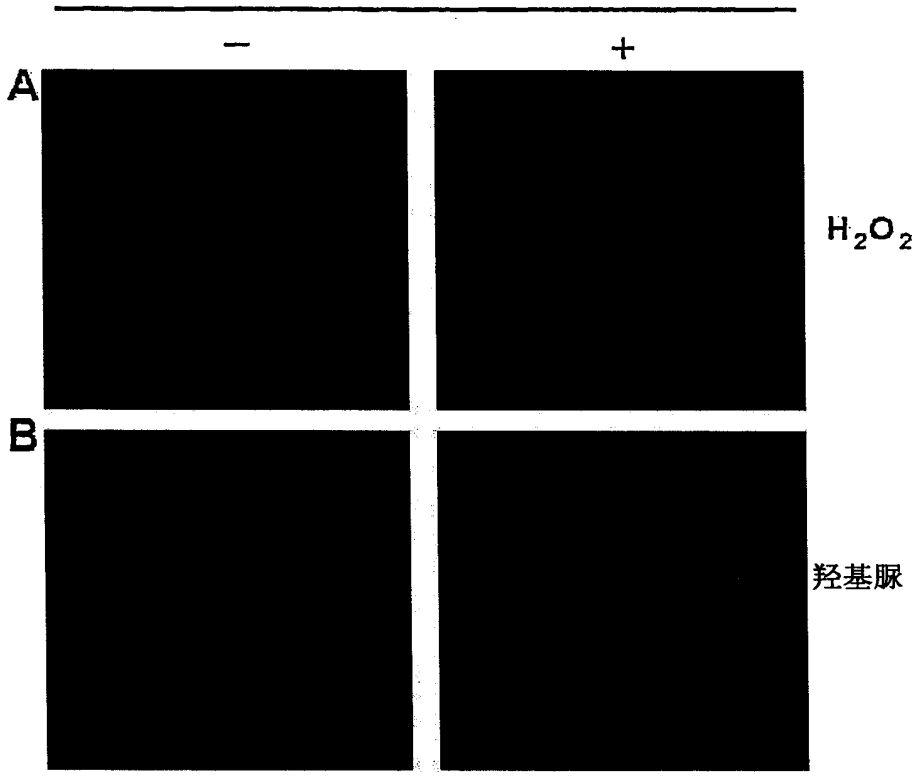

图5

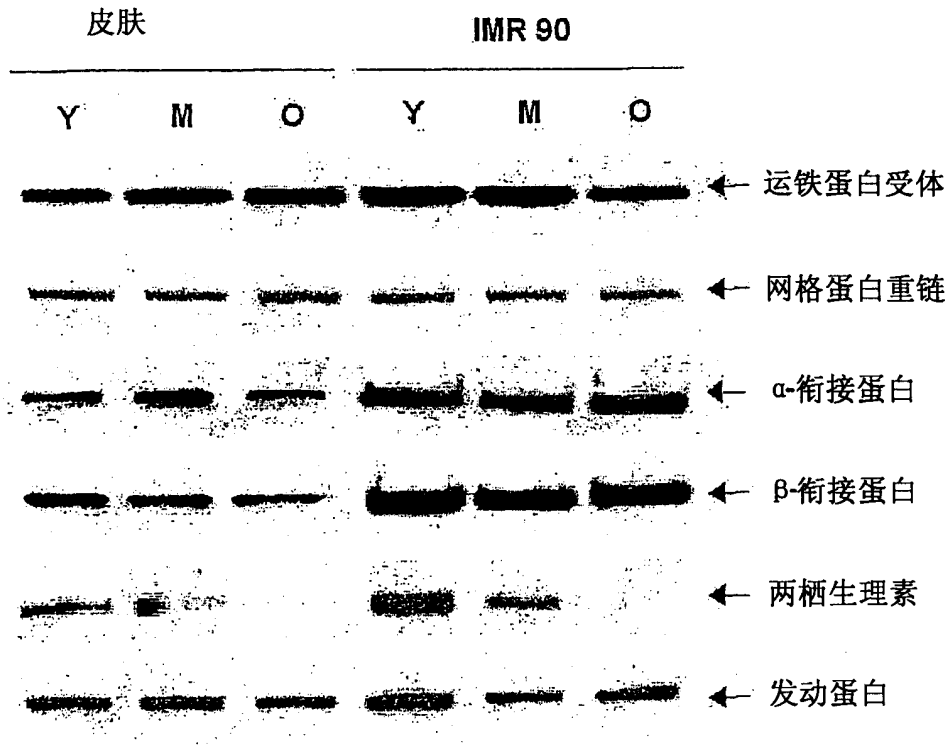

图6

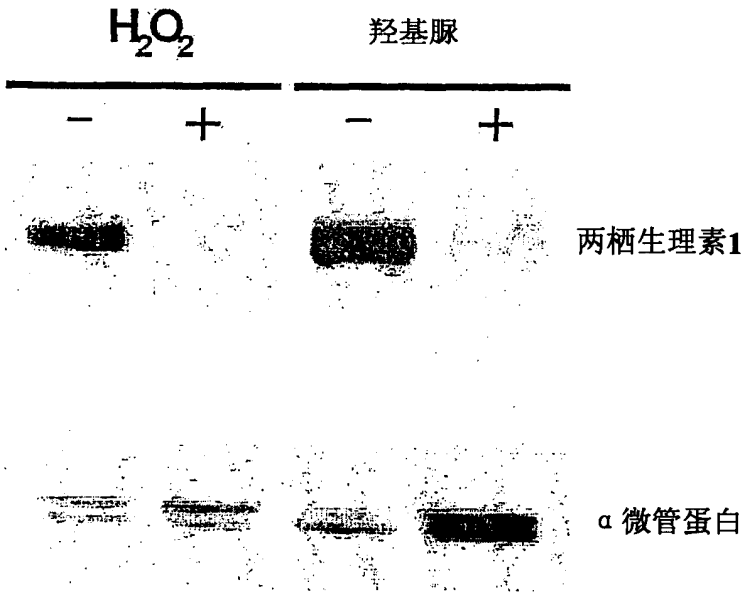

图7

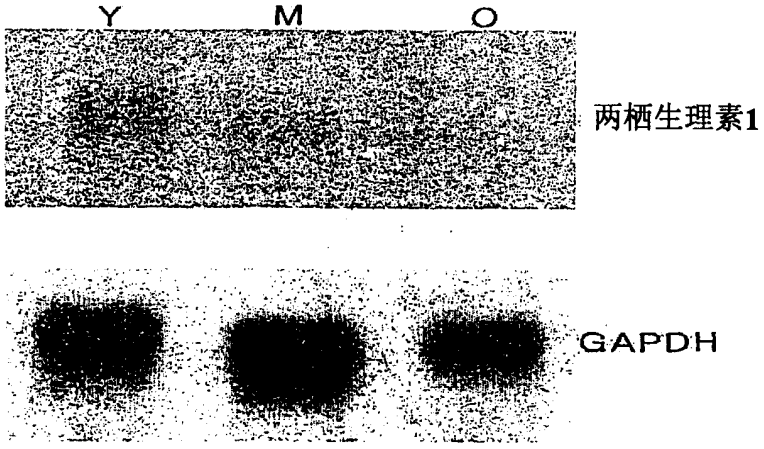

图8

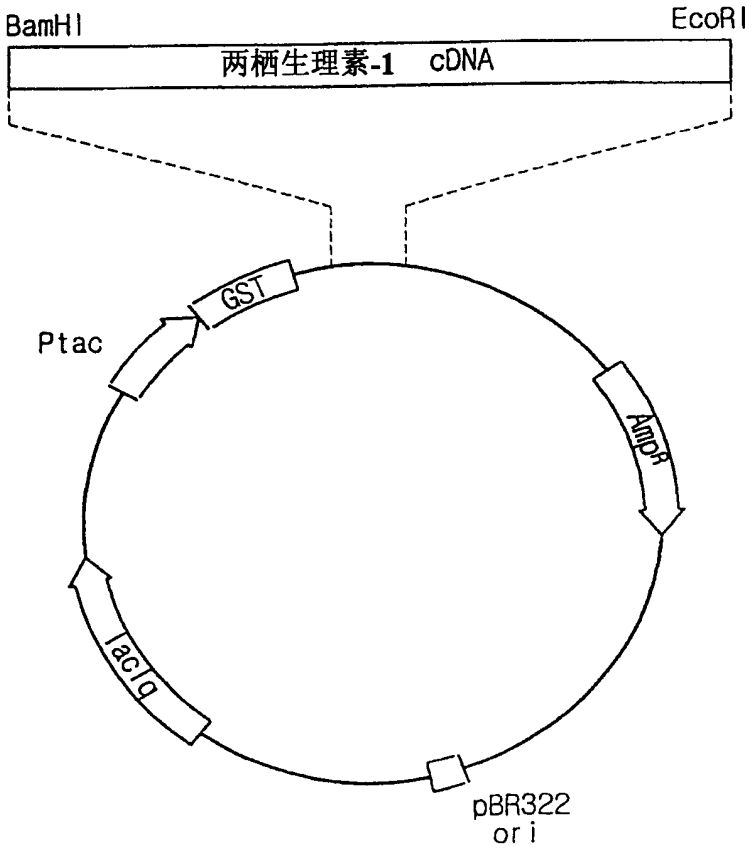

图9

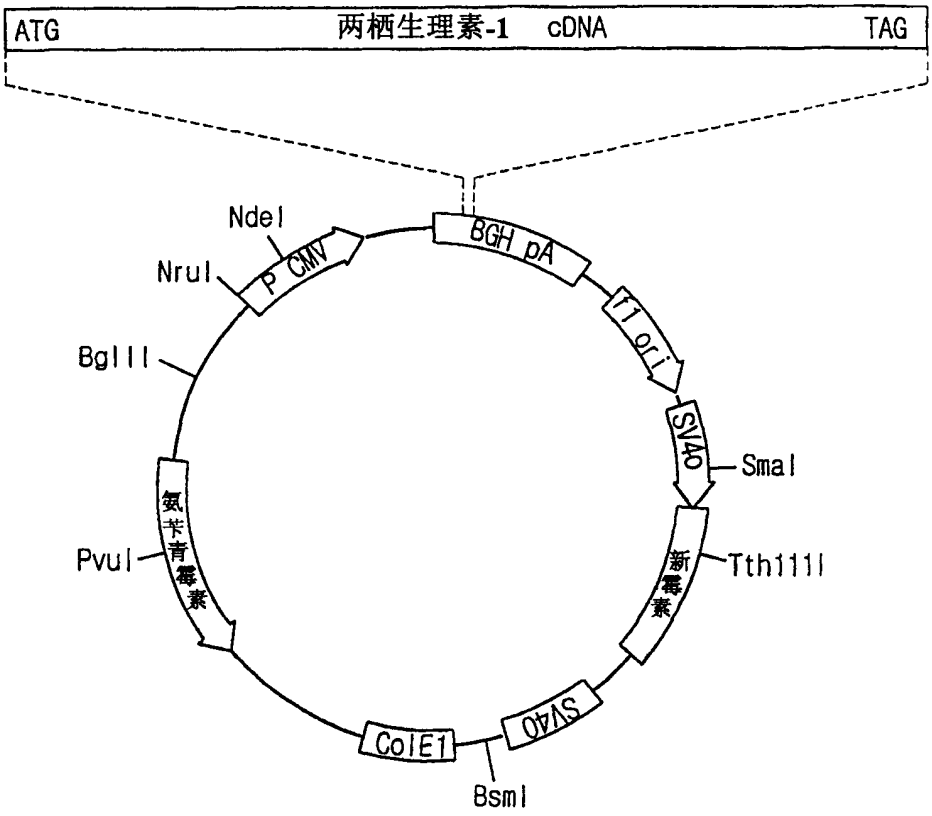
ATG
两栖生理素-1 cDNA
TAG
NdeI
NruI
BglII
PvuI
P CMV
BGH pA
f1 ori
SV40
SmaI
新霉素
Tth111I
SV40
ColE1
BsmI
氨苄青霉素

图10

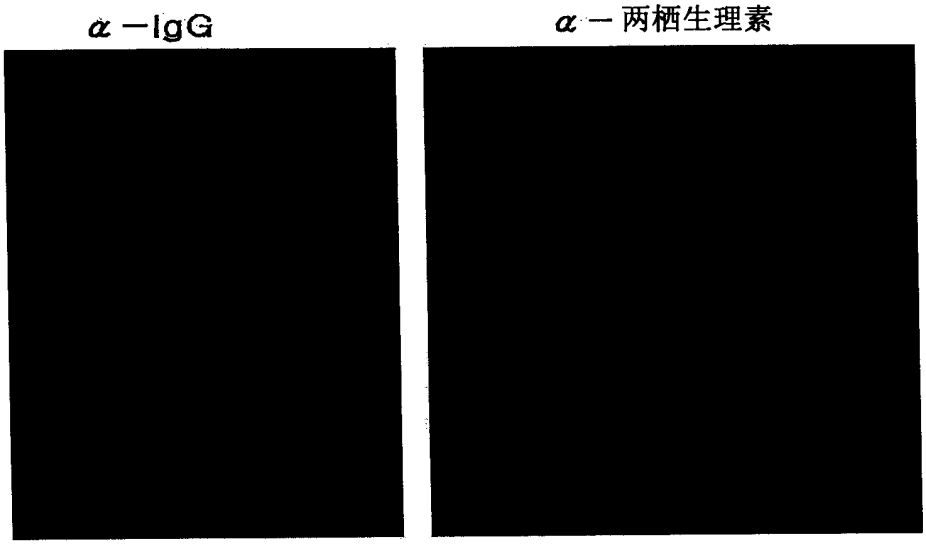

图11

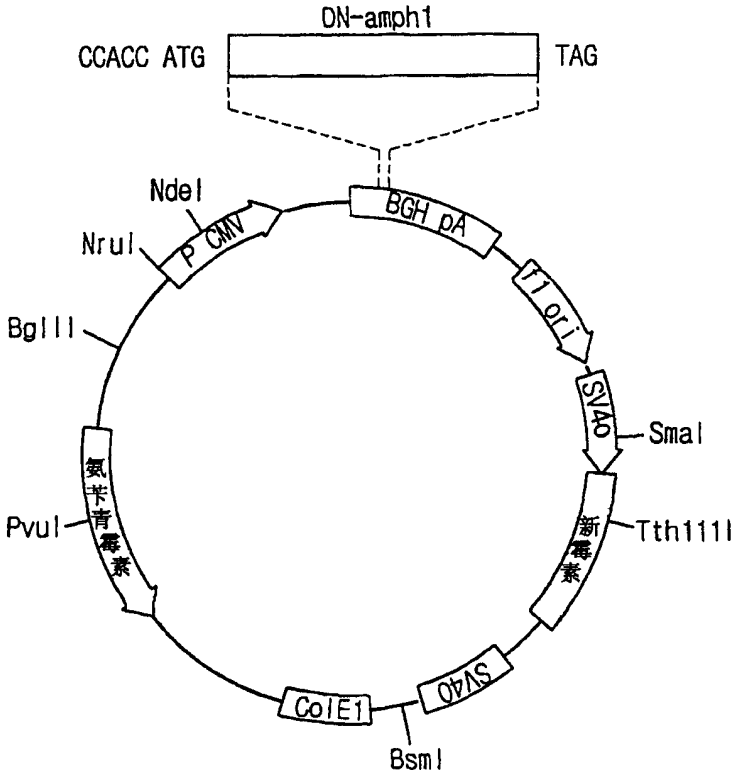
DN-amph1
CCACC ATG
TAG
NdeI
NruI
P CMV
BGH pA
f1 ori
SV40
SmaI
BglII
氨苄青霉素
新霉素
PvuI
Tth111I
ColE1
SV40
BsmI

图12

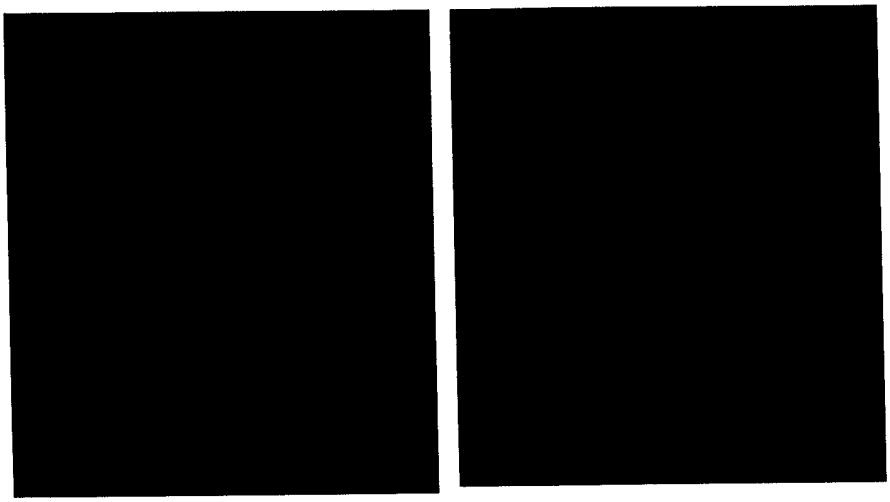

图13a

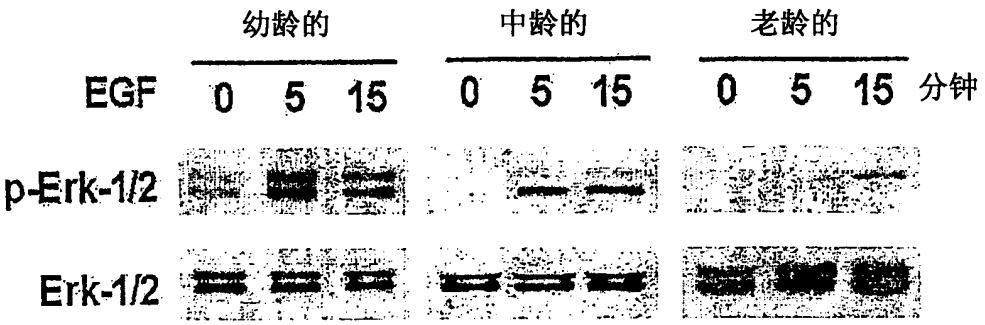
幼龄的
中龄的
老龄的
EGF
0 5 15
0 5 15
0 5 15
分钟
p-Erk-1/2
Erk-1/2

图13b

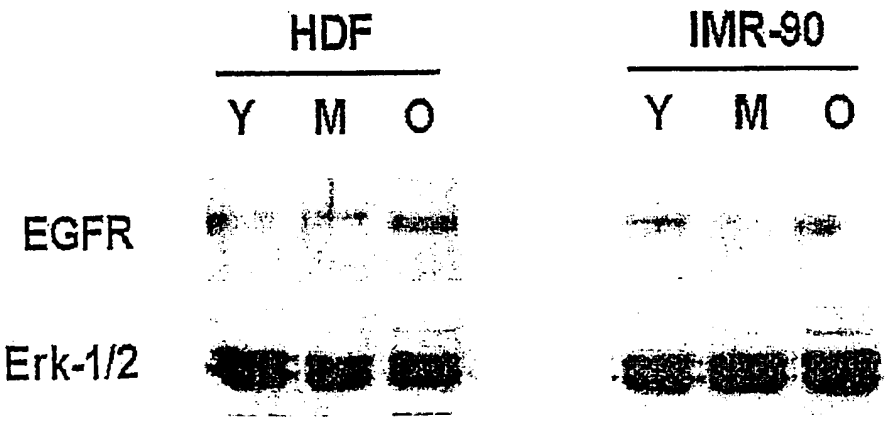
HDF
IMR-90
Y M O
Y M O
EGFR
Erk-1/2

图14

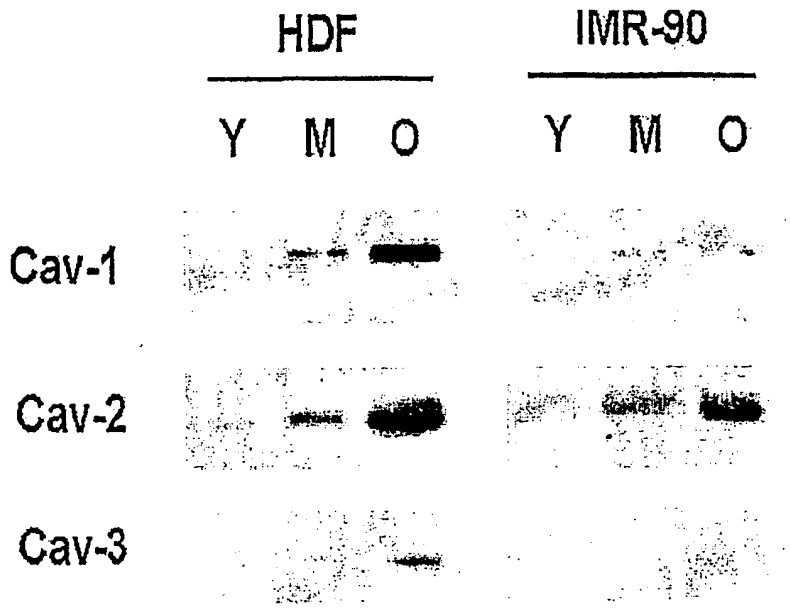

图15

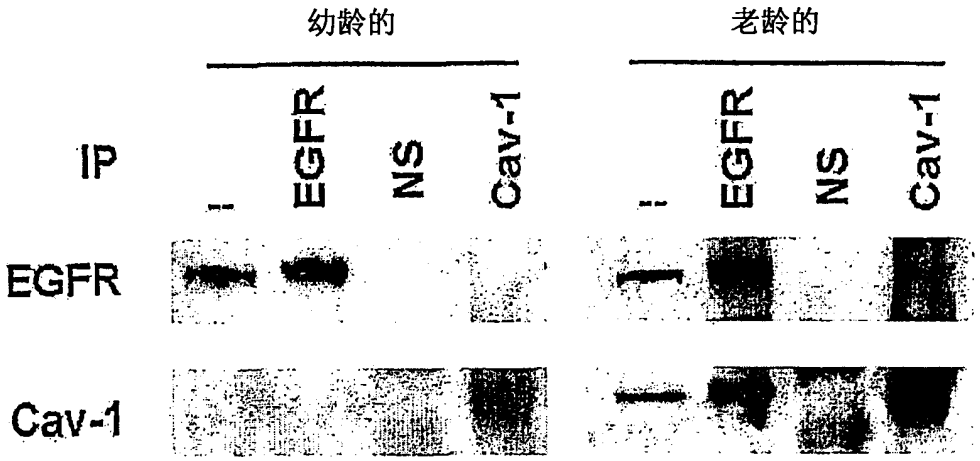

图16

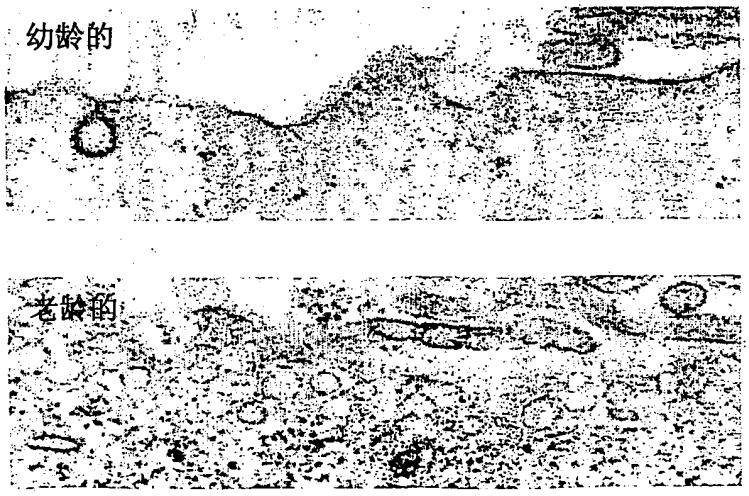

图17

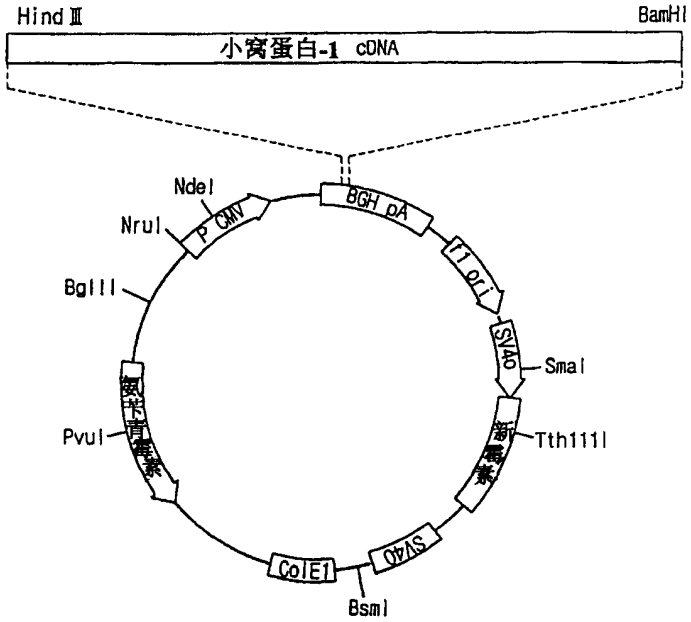
Hind Ⅲ
BamHI
小窝蛋白-1 cDNA
NdeI
NruI
BglII
PvuI
P CMV
BGH pA
f1 ori
SV40
SmaI
Tth111I
ColE1
Bsml

图18

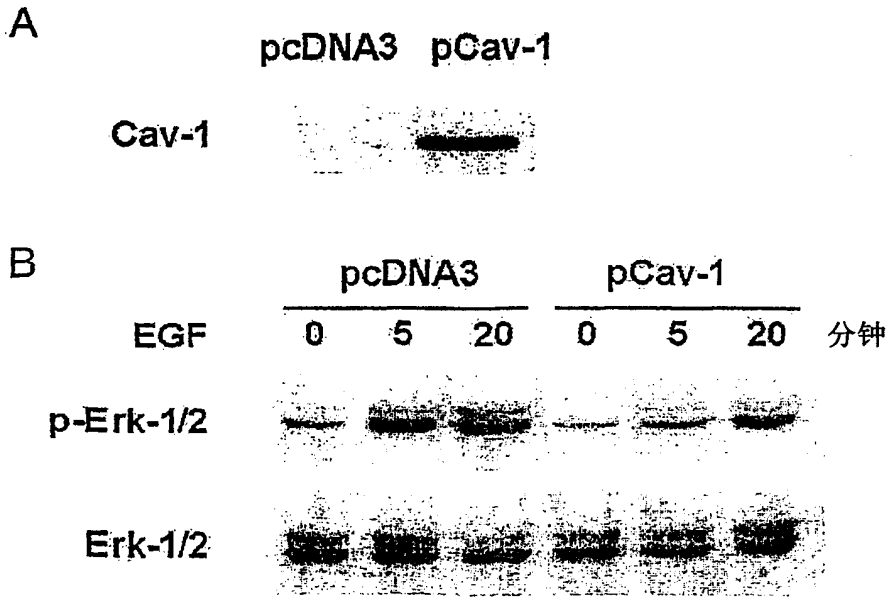
A
pcDNA3
pCav-1
Cav-1
B
pcDNA3
pCav-1
EGF
0
5
20
0
5
20
分钟
p-Erk-1/2
Erk-1/2

图19

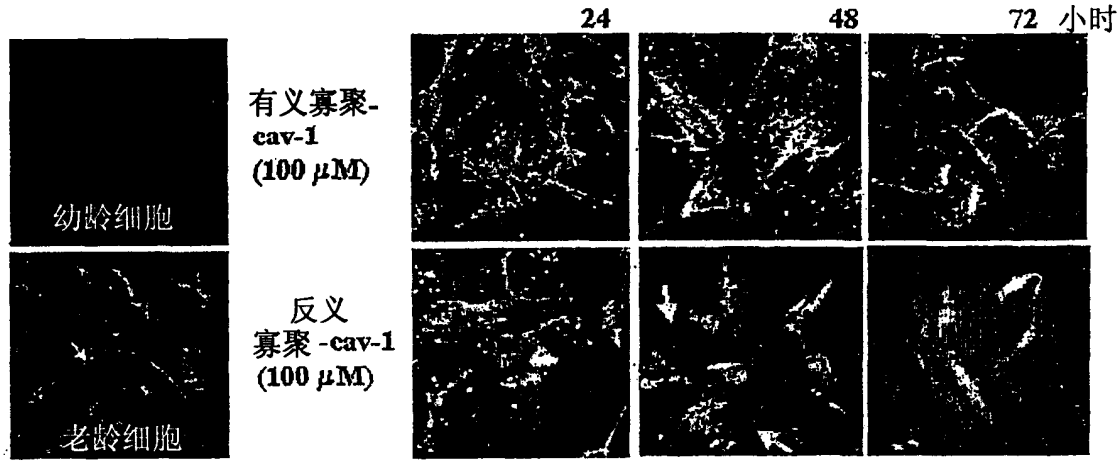

图20

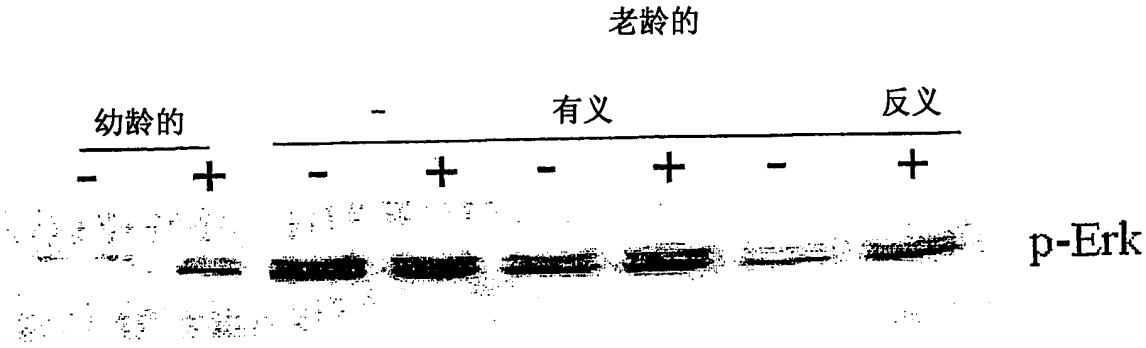

图21

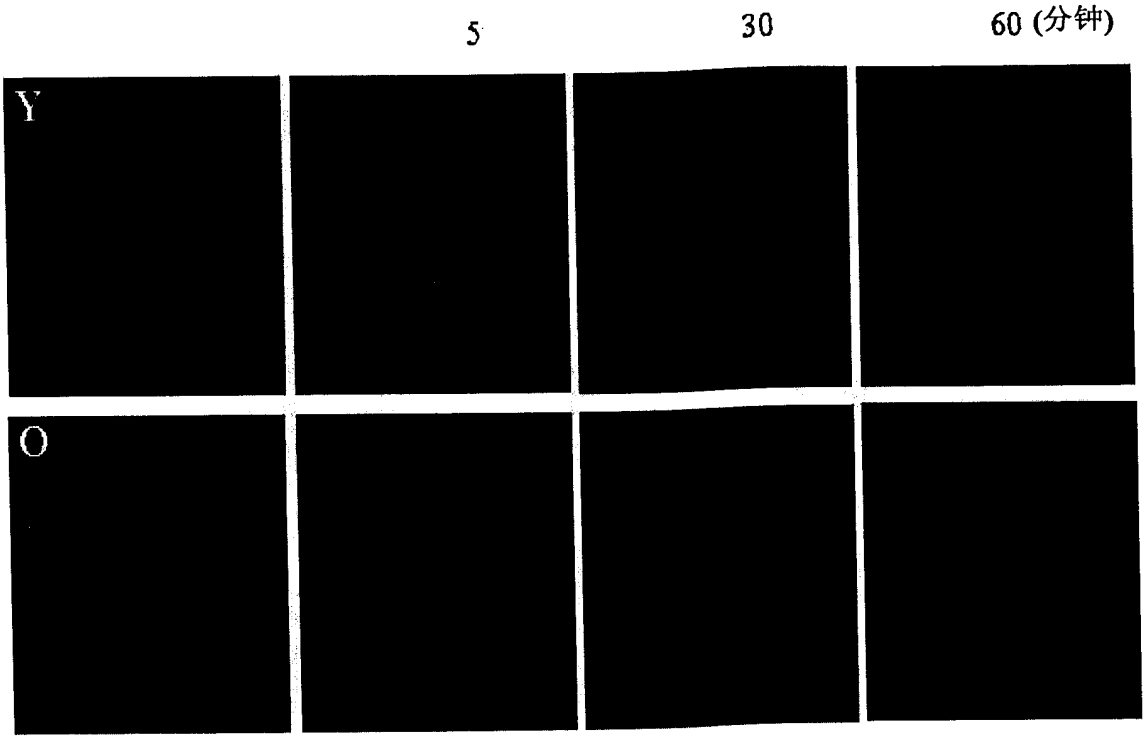

图22

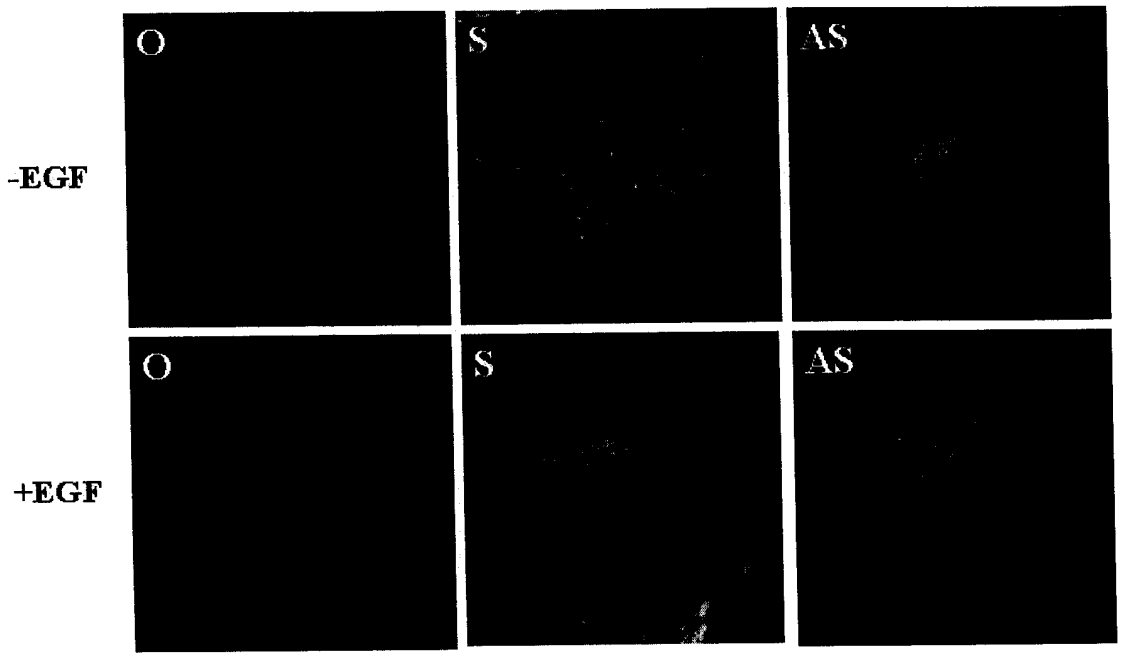

图23a

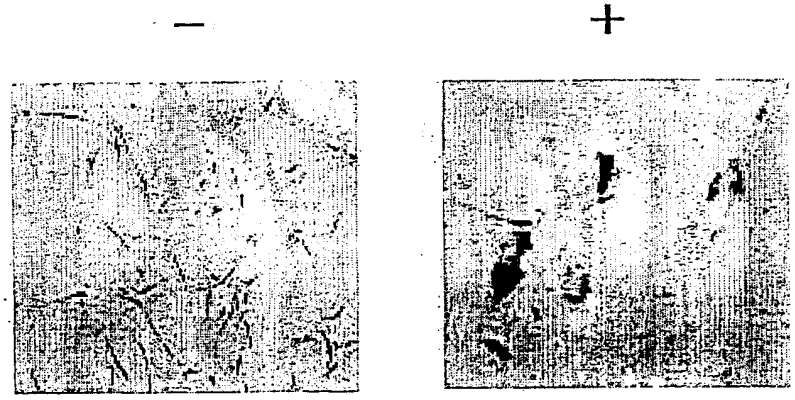

图23b

